



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN-VİTRO KÖPEK MEME TÜMÖRÜ MODELİNDE
SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRÜ VE KEMOTERAPİ
KOMBİNASYONUNUN ANTİTÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MERVE BİŞKİN TÜRKMEN
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuz KUL**

2023 – KIRIKKALE



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN-VİTRO KÖPEK MEME TÜMÖRÜ MODELİNDE
SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRÜ VE KEMOTERAPİ
KOMBİNASYONUNUN ANTİTÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MERVE BİŞKİN TÜRKMEN
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuz KUL**

2023 – KIRIKKALE

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim

Merve BİŞKİN TÜRKMEN

29.08.2023

ÖZET

İN-VİTRO KÖPEK MEME TÜMÖRÜ MODELİNDE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRÜ VE KEMOTERAPİ KOMBİNASYONUNUN ANTİTÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Patoloji (Veteriner) Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Oğuz KUL

Ağustos 2023, 103 sayfa

Köpek ve kedilerde meme kanseri, tüm kanser olgularının %52'sini oluşturmaktadır. Köpek ve insan meme tümörleri arasındaki; moleküler, histolojik, klinik ve epidemiyolojik benzerlikler nedeniyle tanı, patogenezi ve tedaviye yönelik karşılaştırmalı çalışmalar devam etmektedir. Kanser hücre hatları, kanser biyolojisinin incelenmesi, moleküler yolakların ortaya konulması ve antitümöral ilaçların etkinliğinin test edilmesinde in-vitro bir model olarak başarıyla kullanılmaktadır. Meme kanserine yönelik güncel çalışılan konulardan birisi de, COX-2 ifadesine sahip tümörlerde siklooksijenaz (COX) aktivitesinin non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve standart kemoterapinin kombine edildiği tedavi stratejileri üzerinedir. Bu araştırmanın temel amacı, COX-2 ifadesi pozitif insan ve köpek meme tümör hücre kültürlerinde, seçici COX-2 inhibitörü selekoksib ile doksorubisin veya siklofosfamid kombinasyonu yapılarak, tek başına kullanımlarına göre daha yüksek antitümöral etkinlik elde edilip edilemeyeceği ve tümör hücrelerinin COX-2 ifade seviyeleri ile selekoksibin antitümöral etkinliği arasında korelasyon bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Çalışmada; yüksek COX-2 ifadesine sahip CMT-U27 (köpek), P114 (köpek), MDA-MB-231 (insan) ve düşük COX-2 ifadesine sahip CMT-U309 (köpek) meme tümörü hücre hatları 96 kuyucuklu plakalara RealTime-Glo™ MT için herbir kuyucuğa 200 hücre ve MTT testi için her bir kuyucuğa 7×10^3 hücre olacak şekilde ekilip 17 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Bu gruplara sırasıyla: meme tümörü kontrol, meme tümörü taşıt kontrol, 25 μ M selekoksib, 50 μ M selekoksib, 75 μ M selekoksib, 100 μ M selekoksib, siklofosfamid (IC50 dozda), siklofosfamid+25 μ M selekoksib, siklofosfamid+50 μ M selekoksib, siklofosfamid+75 μ M selekoksib, siklofosfamid+100 μ M selekoksib, doksorubisin (IC50 dozda), doksorubisin+25 μ M selekoksib, doksorubisin+50 μ M selekoksib, doksorubisin+75 μ M selekoksib, doksorubisin+100 μ M selekoksib grubu şeklinde ilaç uygulandı. İnkübasyonun 24'üncü saatinde selekoksib ve kemoterapötik ajanların ilk uygulaması yapıldı ve RealTime-Glo™ MT ile 24 ve 48'inci saat bulguları değerlendirildi. 72'nci saat

bulguları için aynı gruplar oluşturuldu ve MTT testi kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. Bu çalışma da, selekoksibin tek başına kullanımının hücre canlılığı üzerinde doza ve hücre hatlarına bağlı olarak farklı etkileri olduğu ortaya konuldu. Özellikle yüksek COX-2 ifadesine sahip P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 72 saat süreyle 50 µM selekoksib uygulaması tümör hücresi proliferasyonunu sırasıyla % 60 ve %55 azalttığı gösterildi. Ancak düşük COX-2 ifadesine sahip CMT-U309 hücre hattında düşük doz selekoksib uygulamasının antiproliferatif etki göstermediği görüldü. Doksorubisinin 25,50,75 ve 100 µM'lık selekoksib ile yapılan tüm kombinasyonlarında 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücre canlılığını, tek başına doksorubisin uygulanan gruba göre önemli ölçüde azalttığı görüldü. Buna karşılık, siklofosfamidin 25,50 ve 75 µM selekoksib ile kombinasyonunda CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının hepsinde, hücre canlılığı tek başına siklofosfamid uygulanan gruba göre daha yüksek bulundu. Sonuç olarak, doksorubisin ile COX-2 selektif inhibitörü selekoksib kombine kullanımı ile in-vitro koşullarda meme kanseri hücrelerinde önemli düzeyde antitümöral etkinlik şekillendiği, bu etkinin her iki ilacın tek başına kullanıldıklarında görülen etkinlik seviyelerine göre additif özellik gösterdiği ve artan selekoksib dozu ile doğru orantılı olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada elde edilen önemli sonuçlardan bir diğeri ise yüksek COX-2 ifadesine sahip meme tümör hücrelerinde, selekoksib uygulaması ile düşük COX-2 ifadesi gösteren meme tümör hücrelerine göre 24, 48 ve 72'nci saatlerde daha yüksek antitümöral etkinlik elde edilebileceğinin gösterilmesidir. Bu çalışma, doksorubisin ve selekoksib kombinasyonunun antitümöral etkisini destekler nitelikteyken, selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun farklı sonuçlar doğurabileceğini göstererek ilaç kombinasyonlarının karmaşıklığını ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: COX-2, in-vitro, meme tümörleri, COX-2 inhibitörleri, kemoterapi.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTITUMOURAL EFFICACY OF A COMBINATION OF CYCLOOXYGENASE INHIBITOR AND CHEMOTHERAPY IN AN IN VITRO CANINE MAMMARY TUMOUR MODEL

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Pathology (Veterinary), Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Oğuz KUL

August 2023, 103 pages

Mammary cancer in dogs and cats accounts for 52% of all cancer cases. Due to the molecular, histological, clinical and epidemiological similarities between canine mammary tumours and human breast cancer, comparative studies on diagnosis, pathogenesis and treatment are ongoing. Cancer cell lines are successfully used as an in-vitro model to study cancer biology, reveal molecular pathways, and test the efficacy of anticancer drugs. One of the current topics in breast cancer is the treatment strategies combining cyclooxygenase (COX) activity with non-steroidal antiinflammatory drugs and standard chemotherapy in COX-2-expressing tumours. The main aim of this study was to investigate whether higher antitumoural efficacy can be obtained by combining the selective COX-2 inhibitor celecoxib with doxorubicin or cyclophosphamide in COX-2 expression positive human and canine mammary tumour cell cultures and whether there is a correlation between COX-2 expression levels of tumour cells and antitumoural efficacy of celecoxib. In the study, CMT-U27 (dog), P114 (dog), MDA-MB-231 (human) and CMT-U309 (dog) breast tumour cell lines with high COX-2 expression and low COX-2 expression were seeded in 96-well plates with 200 cells per well for RealTime-Glo™ MT and 7x10³ cells per well for MTT assay and 17 different study groups were formed. These groups were, respectively, mammary tumour control, mammary tumour vehicle control, 25 µM celecoxib, 50 µM celecoxib, 75 µM celecoxib, 100 µM celecoxib, cyclophosphamide (IC₅₀ dose), cyclophosphamide+25 µM celecoxib, cyclophosphamide+50 µM celecoxib, cyclophosphamide+75 µM celecoxib, cyclophosphamide+100 µM celecoxib, doxorubicin (IC₅₀ dose), doxorubicin+25 µM celecoxib, doxorubicin+50 µM celecoxib, doxorubicin+75 µM celecoxib, doxorubicin+100 µM celecoxib group. At the 24th-hour of incubation, the first application of celecoxib and chemotherapeutic agents was performed and 24th and 48th hour findings were evaluated by RealTime-Glo™ MT. For 72nd-hour findings, the same groups were formed and the results were evaluated using MTT assay. This study demonstrated that the use of celecoxib alone had different effects on cell viability depending on the dose and cell lines. Especially in P114 and MDA-MB-231 cell lines with high COX-2 expression, 50 µM celecoxib treatment for 72 hours decreased tumour cell proliferation by 60% and 55%, respectively. However, in CMT-U309 cell line with low COX-2 expression, low dose celecoxib application did not show antiproliferative

effect. All combinations of doxorubicin with 25, 50, 75 and 100 μ M celecoxib significantly decreased cell viability after 24, 48 and 72 hours compared to doxorubicin alone. On the other hand, in the combination of cyclophosphamide with 25, 50 and 75 μ M celecoxib, cell viability was higher in CMT-U27, CMT-U309, P114 and MDA-MB-231 cell lines compared to cyclophosphamide alone. In conclusion, it was demonstrated that the combined use of doxorubicin and COX-2 selective inhibitor celecoxib resulted in significant antitumoural activity in mammary cancer cells under in-vitro conditions, this effect was additive compared to the activity levels seen when both drugs were used alone and was directly proportional to the increasing dose of celecoxib. Another important result obtained in this study is the demonstration that higher antitumoural activity can be obtained at 24, 48 and 72 hours in breast tumour cells with high COX-2 expression compared to breast tumour cells with low COX-2 expression with celecoxib administration. While this study supports the antitumoural effect of doxorubicin and celecoxib combination, it reveals the complexity of drug combinations by showing that the combination of celecoxib and cyclophosphamide may produce different results.

Key Words: COX-2, in-vitro, mammary tumors, COX-2 inhibitors, chemotherapy.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı yapan, akademik hayata ilk girdiğim günden bugüne; bana farklı düşünmeyi, bilimsel bakış açısı ve bilimsel yazı yazmayı öğreten, yetişmemde teorik ve pratik açıdan en büyük katkıyı sağlayan akademik şansım çok değerli hocam Prof. Dr. Oğuz KUL'a en samimi ve içten duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren, laboratuvarında doktora tezimin deneysel çalışmalarını yapabilmem için imkan sunan Prof. Dr. Sulma MOHAMMED'e;

Doktora tezimde ve bilimsel çalışmalarımda bilgi ve tecrübeleri ile her zaman bana yol gösteren kıymetli hocalarım Doç. Dr. Eray ALÇIĞIR ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ANTEPLİOĞLU'na;

Doktora tezimde, bütün sorularımı sabırla cevaplayan ve yol gösteren Doç. Dr. Fulya ÜSTÜN ALKAN'a;

Her ihtiyacım olduğumda hep yanımda olan YÖK 100/200 Doktora Bursiyeri Erva ESER ve Veteriner Hekim Gözde YALDIZ'a;

Yardımlarından dolayı Arş. Gör. Dr. Mehmet Naci OKTAY ve Arş. Gör. Saniye Büşra LÜLECİ'ye;

Öğrenim hayatım boyunca ideallerimin peşinden koşmam için her türlü desteği vererek daima yanımda olan eşim ve aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	III
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Kanser.....	3
1.1.1. Kanser Etiyolojisi	4
1.1.2. Kanser Mekanizması.....	5
1.1.3. Kanser ve Yangı İlişkisi.....	11
1.1.3.1. COX-2 İfadesi	12
1.1.4. Türkiye ve Dünyada Kanser Epidemiyolojisi.....	13
1.2. Meme Tümörleri.....	16
1.2.1. Köpek Meme Tümörleri	16
1.2.2. Köpek Meme Tümörü Çalışmaları	20
1.2.2.1. İn vivo Çalışmalar	20
1.2.2.2. İn vitro Çalışmalar	20
a) CMT-U27	21
b) CMT-U309	21
c) P114	21
d) MDA-MB-231	22
1.3. Meme Kanseri Tedavisi.....	22
1.3.1. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	22
1.3.1.1. Lokal Tedavi	22
1.3.1.2. Cerrahi Tedavi ve Radyoterapi	23
1.3.1.3. Kemoterapi.....	23
1.3.1.4. Endokrin (hormon) tedavisi	27

1.3.2. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİD'ler) ve Kanserdeki Rollerini	27
1.3.2.1. COX-2/PGE-2 Yolağının Kanserdeki Rolü	28
1.3.2.2. Selekoksibin Farmakolojik Özellikleri	30
1.3.2.3. Selekoksibin Antikanser Etkinlikteki Rolü	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	33
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat	33
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	33
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler	34
2.2. Hücre Hatları	35
2.3. Kullanılan Yöntemler	35
2.3.1. İmmunoperoksidaz Test Protokolü	35
2.3.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması	37
2.3.3. Hemositometrik Hücre Sayımı	37
2.3.4. Selekoksib, Doksorubisin ve Siklofosfamid İlaçlarının Hazırlanması	37
2.3.5. Hücrelerin Dondurulması	38
2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	38
2.4.1. RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılık Testi	38
2.4.2. MTT Hücre Canlılık Testi	39
2.5. Western Blot Analizi	41
2.5.1. Western Blot Analizi İçin Protein İzolasyonu	41
2.5.2. Proteinlerin Bisinkoninik Asit (BCA) Yöntemiyle Ölçümü	42
2.5.3. SDS-PAGE ve Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi	43
2.5.4. Bloklama ve Antikor Ekleme	44
2.5.5. Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi	45
2.7. İstatistik Analizleri	45
3. BULGULAR	46
3.1. İmmunoperoksidaz Test ile COX-2 İfadesi Bulguları	46
3.2. Western Blot Analizi ile COX-2 Protein İfadelerinin Belirlenmesi	48
3.3. Hücre Canlılığı Bulguları	49

3.3.1. Kemoterapötiklerin IC50 Dozunun Belirlenmesi	49
3.3.2. Selekoksibin Düşük ve Yüksek Dozlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri ..	50
3.3.3. Selekoksib ve Kemoterapotik Kombinasyonu 24'üncü Saat Bulguları.....	52
3.3.4. Selekoksib ve Kemoterapotik Kombinasyonu 48'inci Saat Bulguları	61
3.3.5. Selekoksib ve Kemoterapotik Kombinasyonu 72'nci Saat Bulguları	69
4. TARTIŞMA.....	83



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Kanser oluşumunda etkili faktörler	4
Çizelge 1.2. Anjiogenezde rol alan aktivatör ve inhibitör faktörler	7
Çizelge 1.3. Türkiye kanser istatistikleri	14
Çizelge 1.4. WHO köpek meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması	17
Çizelge 1.5. Davis Thompson Vakfı ICD-O3.2 kodlu köpek meme tümörleri sınıflandırması	19
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları	35
Çizelge 2.2. Tedavi gruplarının adlandırılması.....	41
Çizelge 2.3. RIPA buffer hazırlanması.....	42
Çizelge 2.4. Resolving jel ve stacking jel formülasyonu.....	43
Çizelge 2.5. Running buffer hazırlanması	43
Çizelge 2.6. Transfer buffer formülasyonu.....	44
Çizelge 2.7. TBS-T formülasyonu	44
Çizelge 3.1. Meme tümörü hücre hatlarının IC50 değerleri	50
Çizelge 3.2. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	53
Çizelge 3.3. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	54
Çizelge 3.4. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	55
Çizelge 3.5. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	56
Çizelge 3.6. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	57
Çizelge 3.7. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	58
Çizelge 3.8. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	59
Çizelge 3.9. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	60

Çizelge 3.10. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	61
Çizelge 3.11. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	62
Çizelge 3.12. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	63
Çizelge 3.13. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	64
Çizelge 3.14. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	65
Çizelge 3.15. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	66
Çizelge 3.16. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48nci saatte canlılık değerleri	67
Çizelge 3.17. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48nci saatte canlılık değerleri	68
Çizelge 3.18. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	70
Çizelge 3.19. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	70
Çizelge 3.20. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	72
Çizelge 3.21. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	73
Çizelge 3.22. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	74
Çizelge 3.23. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	75
Çizelge 3.24. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı ...	76
Çizelge 3.25. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	77
Çizelge 3.26. DOX+CXB kombinasyon gruplarında P114, CMT-U27, CMT-U309 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24, 48 ve 72'nci saatlerdeki % antiproliferatif etkileri	77

Çizelge 3.27. CYP+CXB kombinasyon gruplarında P114, CMT-U27, CMT-U309 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24, 48 ve 72'nci saatlerdeki % antiproliferatif etkileri78



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Normal hücrenin kansere dönüşmesi için gerekli değişiklikler	5
Şekil 1.2. Tümör mikroçevresinde anjiyogenez mekanizması	8
Şekil 1.3. Karsinogenezin şematik gösterimi	10
Şekil 1.4. Hiperplazi/displazi/kanser progresyonu	11
Şekil 1.5. Dünya kanser istatistikleri	13
Şekil 1.6. Köpeklerde tümör bölgesine göre vaka sayısı	15
Şekil 3.1. Köpek meme tümörü dokularının COX-2 ifadenin immunreaksiyonları	46
Şekil 3.2. Köpek normal meme dokusunda negatif COX-2 ifadesi	47
Şekil 3.3. Ponceau S boyaması ile protein bantlarının tespit edilmesi	48
Şekil 3.4. Köpek meme tümörü hücre hatlarında COX-2 ve β -aktin ifadelerinin Western blot tekniği ile görüntülemesi	49
Şekil 3.5. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası CMT-U27 hücre hattı canlılığına etkisi	51
Şekil 3.6. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası CMT-U309 hücre hattı canlılığına etkisi	51
Şekil 3.7. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi	52
Şekil 3.8. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası P114 hücre hattı canlılığına etkisi	52
Şekil 3.9. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	53
Şekil 3.10. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	54
Şekil 3.11. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	55
Şekil 3.12. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	56
Şekil 3.13. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	57
Şekil 3.14. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	58
Şekil 3.15. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	59
Şekil 3.16. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri	60

Şekil 3.17. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	61
Şekil 3.18. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	62
Şekil 3.19. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	63
Şekil 3.20. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	64
Şekil 3.21. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	65
Şekil 3.22. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	66
Şekil 3.23. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	67
Şekil 3.24. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saatte canlılık değerleri	68
Şekil 3.25. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	69
Şekil 3.26. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	70
Şekil 3.27. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	71
Şekil 3.28. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	72
Şekil 3.29. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	73
Şekil 3.30. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	74
Şekil 3.31. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	75
Şekil 3.32. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı	76
Şekil 3.33. CMT-U27 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları	79
Şekil 3.34. CMT-U309 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları	79
Şekil 3.35. MDA-MB-231 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları	80
Şekil 3.36. P11 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları	80
Şekil 3.37. CMT-U27 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.	81
Şekil 3.38. CMT-U309 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları	81

Şekil 3.39. P114 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

82

Şekil 3.40. MDA-MB-231 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

82



SİMGELER DİZİNİ

$\kappa\beta$: Kappa-Beta

M: Molar

α : Alfa

β : Beta

$^{\circ}\text{C}$: Celcius santigrad derece

μ : Mikro

%: Yüzde

<: Küçüktür

>: Büyüktür

TM: Ticari marka

®: Tescilli

p: İstatiksel önem değeri

KISALTMALAR DİZİNİ

μl : Mikrolitre

μM : Mikromol

μm : Mikrometre

CYP2C9: Sitokrom P450 Ailesi 2 Alt Aile C Üyesi 9

5-FU: 5-florourasil

AJCC: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi

Akt: Protein kinaz B

APS: Amonyum Persülfat Solüsyonu

Bad: Bcl2 ile İlişkili Hücre Ölümü Agonisti

BAX: Bcl2 Benzeri Protein 4

BCA: Bisinkoninik Asit

Bcl-2: B hücre Lenfoma 2

bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

CAF: Kanserle İlişkili Fibroblastlar

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CasII-gly: Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) (glycinato)

CC1: Silkofosfamid+25 μM Selekoksib

CC2: Silkofosfamid+50 μM Selekoksib

CC3: Silkofosfamid+75µM Selekoksib
CC4: Silkofosfamid+100µM Selekoksib
CDH11: Kaderin-11
cDNA: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
CK: Sitokeratin
CMT-U27: Köpek Meme Tümörü U27
CMT-U309: Köpek Meme Tümörü U309
CO2: Karbondioksit
COX: Siklooksijenaz
COX-1: Siklooksijenaz 1
COX-1b: Siklooksijenaz 1 b
COX-1v: Siklooksijenaz 1 v
COX-2: Siklooksijenaz-2
COX-3: Siklooksijenaz 3
CREB: cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
CXB: Selekoksib
CYP: Siklofosfamid
DAB: 3,3'-Diaminobenzidin
DC1: Doksorubisin+25µM Selekoksib
DC2: Doksorubisin+50µM Selekoksib
DC3: Doksorubisin+75µM Selekoksib
DC4: Doksorubisin+100µM Selekoksib
ddH2O: Ultra Saf ve Steril Su
dH2O: Saf Su
DMEM: Dulbecco'nun Değiştirilmiş Eagle Ortamı
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DOX: Doksorubisin
DPBS: Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin
ECL: Geliştirilmiş Kemilüminesans
EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EP1: Prostaglandin E2 Reseptörü 1
EP2: Prostaglandin E2 Reseptörü 2
EP3: Prostaglandin E2 Reseptörü 3
EP4: Prostaglandin E2 Reseptörü 4
ER: Östrojen Reseptörü
FAM: Fosforamid Mustard
FBS: Fötal Sığır Serumumu
FDA: Gıda ve İlaç İdaresi
F-dUMP: Florodeoksiüridilat
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
G α scAMP-ERK: Siklik Adenozin Monofosfat Ekstraselüler Sinyal İlişkili Kinaz
G1: Gap 1 Faz
G2: Gap 2 Faz
GATA3: GATA Bağlayıcı Protein 3
G-CSF: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GLOBOCAN: Küresel Kanser Gözlemevi
GM-CSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GPCR: G-protein Eşli Reseptörler
HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HRP: Bayır Turpu Peroksidazı
IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC50: Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu
ICAM-1: Hücre içi adhezyon molekülü-1
ICD-O: Uluslararası Onkoloji Hastalıkları Sınıflandırması
IDO1: İndolamin-2, 3-dioksijenaz Geni
IL-1: İnterlökin-1
IL-1 β : İnterlökin-1beta
IL-2: İnterlökin-2
IL-2Ra zinciri, TCR β zinciri
IL-6: İnterlökin-6
I- κ Ba: Nükleer faktör kappa B intibitörü
kDa: Kilodalton
LSM: En Küçük Kareler Ortalaması

M: Mitoz
M2: Makrofaj tip 2
MAPK: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MAPKK: Mitojenle Etkinleştirilen Protein Kinaz Kinaz
MDA-MB-231: İnsan Mem Kanseri Hücre Hattı
MEKK: Mitojenle Etkinleştirilen Protein Kinaz Kinaz
MEP: Miyoeptilyom
MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Myd88: Miyeloid Farklılaşması Birincil Yanıtı 88
Naci: Sodyum Klorür
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF- K β : Nükleer Faktör-k β
NSAİD: Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaç
OD570b: Kontrol (Kör) Grubunun Optik Yoğunluğu
OD570e: Kumunenin Optik Yoğunluğunun Değeri
P114: Karsinom Hücresi 114
P450: Sitokrom P450
p53: Tümör Protein P53
PAP: Papillomatoz
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PG: Prostaglandin
PGDS: Prostaglandin-D Sentaz
PGES: Prostaglandin-E Sentaz
PGIS: Prostaglandin-I Sentaz
PGD2: Prostaglandin D2
PGE2: Prostaglandin E2
PGH2: Prostaglandin H2
PGI2: Prostaglandin I2
PGF2 α : Prostaglandin H2 Alfa
Ph: Hidrojen Potansiyeli
PI3K: Fosfoinosidit 3 Kinaz
PKC: Protein kinaz C

PLC: Fosfolipaz C
PR: Progesteron Reseptör
RAS: Retiküler Aktivasyon Sistemi
RIPA: Ristosetin Etkili Trombosit Agregasyonu
RNA: Ribonükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
rpm: Dakikada Devir Sayısı
RPMI: Roswell Park Memorial Enstitüsü Besi Yeri
S: Sentez Fazı
SCC: Skuamoz Hücreli Karsinom
SD: Standart Sapma
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez
SEM: Ortalamanın Standart Hatası
TBS: Tris Tamponlu Salin
TBS-T: Tris Tamponlu Salin- Polisorbat 20
TEMED: Tetrametiletildiamin
TGF: Tümör Büyüme Faktörü
TKI: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TLR/: Toll Benzeri Reseptör
TN: Triple Negatif
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör - α
TPA: Doku Plazminojen Aktivitörü
Tris-HCl: Tris Hidroklorid
TxA2: Tromboksan A2
TxB2: Tromboksan B2
UV: Ultraviyole
UVB: Ultraviyole B
VCAM-1: Vasküler Hücre Yapışma Molekülü 1
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
 α -TEA: Alfa-tokoferiloksiasetik Asit

α -TOS: Alfa-tokoferil Süksinat



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yeni bölünen hücrelerin büyümesi ve yaşlanan hücrelerin ölmesi arasında hassas bir homeostaz bulunur. Bu dengenin herhangi bir yönde bozulması, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde artışına sebep olur ve kansere zemin hazırlar. Kanser, dünyada en yaygın ölüm sebepleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almakta ve görülme sıklığı günden güne artmaktadır. Kanser olgularının yaklaşık %90-95'i, çevresel faktörlerden kaynaklanan somatik mutasyonlar, kalan %5-10'luk kısmı ise kalıtsal genetikten kaynaklanmaktadır. Kanser oluşumuna neden olanyaygın çevresel faktörler arasında; tütün kullanımı (%25-30), diyet ve obezite (%30-35), enfeksiyonlar (%15-20), radyasyon (iyonize ve iyonize olmayan, %10), fiziksel aktivite eksikliği ve çevre kirliliği bulunmaktadır (Anand vd., 2008).

Eskiden çoğunlukla insanlarda sık görülen kanser olguları; köpeklerde de artan yaşam süreleriyle doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Artık kanser, köpeklerde tüm dünyada en önemli morbitite ve mortalite nedenleri arasında gösterilmektedir. Her yıl yaklaşık 6 milyondan fazla kedi ve köpekte kanser teşhis edilmektedir (Hansen ve Khanna, 2004). Köpekler, insanlarda oluşan kanser türlerinin çoğuna karşı yatkınlığa sahiptir. Bununla birlikte; hem dünyada hem de ülkemizde insan ve hayvalarda en sık görülen ve mortalitesi en yüksek kanser türlerinin başında meme tümörleri gelmektedir.

En yüksek maliyetli hastalık tedavileri arasında yer alan kanserin tedavisinde; cerrahi ekstirpasyonun yanı sıra tek bir kemoterapötik ajan veya kombine bir kemoterapi protokolü kullanımı neredeyse tüm insan ve hayvan kanserleri için standart hale gelmiştir.

Kanser ve kronik yangı arasındaki ilişki, ilk kez Rudolf Virchow' un kronik yangı bölgesinde şekillenen hücre proliferasyonunu keşfi ile gösterilmiştir. Kanser mikroçevresinde; konak bağışıklık yanıtı, damar ağı oluşumları ve yangısal reaksiyonlarla karakterize bulguların şekillenmesi, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİD)'ın kanserin tedavisinde veya kanser gelişimini önlenmesinde rol alabileceğini

düşündürmektedir (Wong, 2019). Siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi yangı bölgesinde ve bazı kanserli dokularda aşırı eksprese edilir. COX-2 ifadesi; karsinom oluşumu, indüksiyonu, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişiminde pleiotropik ve çok yönlü bir rol oynar. COX-2, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF), tip 2 makrofajlar (M2) ve kanser hücreleri tarafından tümör mikroçevresine salgınır (Najafi vd., 2019). Çoklu sinyaller, COX-2' nin kanser hücreleri üzerindeki işlevlerine veya düzenlenmesine katkıda bulunur. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve nükleer faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), kanser hücrelerinde COX-2 ifadesini artıran başlıca modülatörlerdir. Esasen, COX-2'nin bir metaboliti olan prostaglandinler (PG) ve sitokinler, NF- $\kappa\beta$ 'yi sinerjistik olarak aktive ederek PG aracılı pozitif geri besleme döngüleri oluşturur. Sonuç olarak, bu sinyal, yangı ile ilişkili genlerin ifadesini indüklemek için makrofajlarda ve nötrofillerde çeşitli NF- $\kappa\beta$ aracılı genlerin ifadesini artırır ve bu hücrelerin sürekli infiltrasyonuna neden olur. (Liu vd., 2017).

Seçici COX-2 inhibitörü olan selekoksib, uzun yıllardır antiinflamatuvar ilaç olarak kullanılmaktadır. İn-vitro koşullarda hücre büyümesini inhibe eder ve tümör hücrelerinde mitokondriyal apoptozisi indükleyerek antitümöral etkinlik gösteren selekoksib, in-vivo etkinliğini tümör mikroçevresinde PG sentezinin engellenmesine bağlı olarak yangı, neovaskülarizasyon ve tümör hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile gösterir. Selekoksibin anılan bu etkinlikleri konusunda mevcut literatürde çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte, selekoksib ve kemoterapötik kombinasyonlarının, farklı kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri doz-yanıt eğrisi şeklinde net bir şekilde raporlanmamıştır.

Bu çalışmada, selekoksib'in düşük ve yüksek konsantrasyonlardaki doz-yanıt eğrisinin oluşturulması, selekoksibin tek başına ve kemoterapötiklerle kombinasyonunun antitümöral etkinlik üzerindeki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, farklı derecelerde COX-2 ifadesine sahip P114, CMT-U27, CMT-U309, köpek meme tümörü hücreleri ve MDA-MB-231 insan meme tümörü hücre hattında farklı doz ve sürelerde selekoksib ve doksorubisin, selekosib ve siklofosfamid ile kombinasyonunun, antitümöral etkinliği ortaya konulmuştur.

1.1. Kanser

Normalde organizmadaki hücreler, ihtiyaç duyulan yeni hücreleri oluşturmak için proliferasyon sürecine girerek çoğalırlar ve yeteri kadar büyüyüp yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ise ölürlere ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazen bu düzenli siklus bozularak, hatalı genetik yapıya sahip hücreler ölmeleri gerektiği halde büyüyüp çoğalmaya devam ederler. Tümörler, hücrelerin olması gerekenden daha fazla bölünmesi veya genetik mutasyon oluşan hücrelerin ölüm sürecine girmemeleri nedeniyle vücudun hemen her yerinde başlayan ve trilyonlarca hücreden oluşabilen anormal doku kitleleridir (Hanahan vd., 2011).

Kanser, en eski tıbbi kayıtların tutulmasından bu yana, ilk olarak Yunan hekim Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Geçmişten bugüne kadar gelen bilgilere göre kanser, bir organizmada proliferasyon ve büyüme kontrol yeteneğini kaybetmiş hücrelerde meydana gelen kontrolsüz ve anormal büyüme sonucu, öncelikle geliştiği dokuda, daha sonrasında vücudun diğer bölgelerine yayılan ve organizmanın işlevini bozan bir hastalıktır (Patel, 2020).

Gen mutasyonları, hücrelerin büyümesi ve çoğalarak tümör oluşturmaya neden olabilmektedir (Evans vd., 2018). Normalde vücut DNA'sı hasarlı hücreleri kansere dönüşmeden önce yok edebilirken, yaşlandıkça bu yetenek azalır. Bu durum, artan yaşla birlikte kanser oluşumunun neden daha yüksek olduğunu açıklayan nedenlerden biridir. Kanser geliştikçe ilave mutasyonlar ve genetik değişiklikler meydana gelebilir, dolayısıyla aynı tümör kitlesinde bile farklı hücreler farklı genetik değişikliklere sahip olabilirler (Jin vd., 2019).

Normal gelişim ve hücre diferensiasyonu genlerle yönetilen biyolojik bir döngüdür, ancak herhangi bir genetik mutasyon sonucu bu döngü bozulur ve malignite yönünde değişiklik gösterebilir. Hücre döngüsü interfaz (G1,S ve G2 fazı) ve mitoz (M fazı) olmak üzere temel iki kısımdan oluşur. Bir mitozun bitip diğerinin başlamasına kadar geçen evreye interfaz, görünür mitoz karşılık gelen bölünme periyoduna da M fazı denir. Hücre siklusundaki iki kontrol noktası G1 ve G2 nin sonundadır. G1, bölünmeye giden hücrede RNA ve protein sentezi aşaması olup DNA replikasyonunun başlaması G1 fazının bitip S fazına girildiğini gösterir. RNA ve protein sentezi ise interfazın üç evresinde de (G1, S,

G2) devam eder. Hücre döngüsünde evreden evreye geçişin kontrol edildiği geçiş noktaları vardır. Üçüncü ve diğer bir önemli bir kontrol noktası da metafazda kromozomların dizilmelerini düzenler. P53 hücre döngüsünü düzenleyen ve kanserin baskılanması için çok önemli bir proteindir. DNA hasarlarında, tamir için gerekli proteinleri harekete geçirir veya DNA hasarının tamir edilemeyecek kadar fazla olduğunda apoptozu başlatır. Apoptoz, istenmeyen hasarlı ve tamir edilemeyen hücrelerin ölümü için aktif bir program sağlar. Apoptoz bir çok uyarı ile tetiklenebilir. Bunların en yaygın olan yolağı DNA hasarı ile uyarılmış p53'ün BAX sentezini aktive edip, Bcl-2 sentezini baskılamasıdır.

1.1.1. Kanser Etiyolojisi

Kanser oluşumunda etkili çok sayıda kimyasal, fiziksel ve biyolojik etken (kanserojen; karsinojen) tanımlanmıştır. Hem çevresel (tütün, radyasyon, kimyasallar, bulaşıcı organizmalar vb.) hem de kalıtsal faktörler (mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık vb.) kanserin başlaması ve progresyonunda rol oynamaktadır. Kansere yol açabilecek faktörler iç ve dış faktörler olarak iki başlıkta altında toplanabilir.

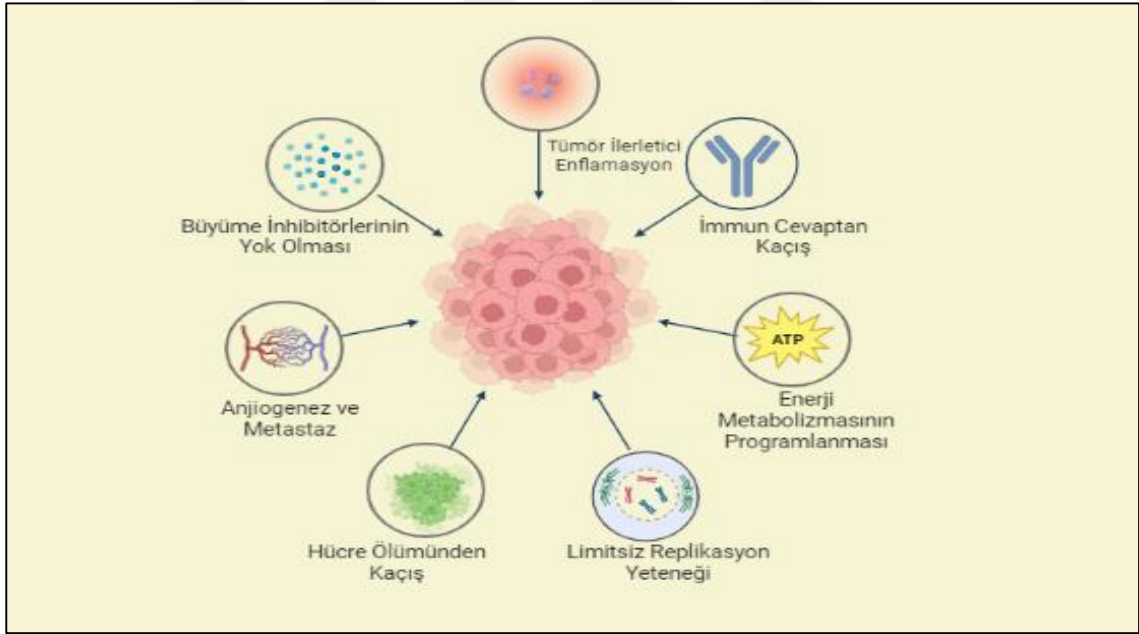
Çizelge 1.1. Kanser oluşumunda etkili faktörler (Anonim, 2023a)

İÇ ETMENLER (%15)	DIŞ ETMENLER (%85)
Yaş	Radyoaktif etkenler (X ışınları, Mor ötesi ışınlar)
Cinsiyet	Kimyasal Etkenler
Kalıtsal nedenler ve genetik bozukluklar	Bazı bakteriyel ve viral etkenler
Bağışıklık sistemi yetersizlikleri	Toplumsal nedenler (Ruhsal bozukluklar, Stres)
Hormonal ve metabolik bozukluklar	Sigara, alkol
Değişimler	Coğrafik ve bölgesel etkenler

Bu etkenler tek başlarına veya birlikte ardışık olarak etki ederek kanserin oluşmasını başlatabilirler (Torre vd., 2015). Hücre DNA'sına hasar veren ve anormal yapıda hücre gelişmesine sebep olabilen çok sayıda karsinojen tanımlanmıştır. Kanser oluşumuna

katkı sağlayan genetik değişiklikler, temelde proto-onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA hasarını onaran genler olmak üzere üç ana gen grubunu etkilerler (Sudhakar, 2009). İnsan ve hayvanları etkileyen 100'ü aşkın kanser türü vardır ve kanser hücreleri gelişimin erken aşamasında hiçbir belirti veya semptom göstermezken, laboratuvar testleri ve/veya radyolojik rutin testlerle “tesadüfen” tespit edilebilirler. Genel olarak, kanserin tespit edilebilmesi için 1cm büyüklüğe ulaşması veya en az 1 milyon hücreden oluşması gerekir (Roy ve Saika, 2016)

Normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşmesinde etkili, çoğu tümörde ortak olan temel altı değişiklik tespit edilmiştir. Bu değişiklikler; büyüme hormonlarının üretimi ve/veya büyüme inhibitörlerinin yok olması, enerji metabolizmasının programlanması, limitsiz replikasyon potansiyeli, hücre ölümünden kaçınma, tümör ilerletici inflamasyon-anjiogenez-metastaz ve immün cevaptan kaçınmadır (Hanahan vd., 2000).



Şekil 1.1. Normal hücrenin kansere dönüşmesi için gerekli değişiklikler (Hanahan, 2022'den tasarlanarak çizilmiştir).

1.1.2. Kanser Mekanizması

Normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşmesi aşaması, kitlenin oluşum süreçleri değerlendirildiğinde en kritik aşama olarak kabul edilmez, çünkü vücuttaki bağışıklık hücrelerinin, yeni oluşan kanser hücrelerini sayıca azken tanıyıp yok etmesi ile geri dönüş

mümkündür (Bray ve Moller, 2006). Bu aşamada devamlı strese maruziyet, yaşlılık, kronik hastalıklar, daha önce kemoterapi tedavisi görmüş olmak, antibiyotik ve kortikosteroid gibi ilaçların kullanılması gibi faktörlerin etkisiyle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde kanser riski katlanarak artmaktadır.

Karsinogenez, normal bir hücrenin bir dizi premalign fenotipler yoluyla invaziv kanser ortaya çıkana kadar ilerlediği çok adımlı bir süreçtir. Retroviruslar hariç diğer tüm kanser türlerinin gelişiminde bu basamaklar geçerli sayılmaktadır (Vincent ve Gatenby, 2008). Kanser gelişimi ile ilişkili olarak bu çok adımlı sürecin basamakları aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

Kanser Oluşumu-İndüksiyon Fazı: Kimyasallar, radyasyon, virüsler ve kalıtım gibi kansere sebep olabilecek etkenlere maruz kalmayla kanser oluşumunun başladığı evredir (Finch, 2007).

İnisiyasyon: Genellikle tek bir somatik hücre'nin DNA'sında meydana gelen geri dönüşümsüz değişikliktir. Bu somatik mutasyonlar mitoz sonrasında inisiyatör maddelerin etkisi ile rastlantısal olarak meydana gelir. Latent evre olarak isimlendirilen bu ilk etkileşim aşaması birkaç yıl sürer (Shacter ve Weitzman, 2002).

Promosyon: İnisiye hücre ve bu hücreden gelişen popülasyonlarda promotörlere maruziyet sonucu indüklenen selektif büyüme aşamasıdır. Epigenetik değişiklikler bu aşamada oluşur ve geri dönüşümlüdür. Bu selektif büyüme aşaması sonunda küçük ve iyi huylu tümörler meydana gelir. Burada hücrenin genotipik değişiminden daha çok fenotipik değişiklikler görülür (Harris vd., 2015).

Klonal Gelişme: Kanser hücrelerinin, aynı genetik materyale sahip başka hücreler üretmesidir. Kısaca bu aşamada transformasyona uğramış bir hücre çoğalarak genotipik ve fenotipik olarak birbirine benzer yapıda kümeler oluşturur. Temelde tüm hücreler benzer yapıdadır, ancak buldukları organ ve dokuya bağlı olarak bazı farklı özelleşmeler kazanırlar (Cook ve Figg, 2010).

Anjiyogenez: Kan damarlarıyla beslenemeyen kanser kolonileri gelişemezler ve en fazla 1-2 mm'lik bir boyuta ulaşabilirler. Beslenmesi henüz tamamlanmamış kanser kolonilerinde proliferasyon devam ederken aynı hızda hücre ölümü de devam eder. Ancak, bölgede anjiyogenez ile kanlanma sağlandıktan sonra hücre ölüm hızı yavaşlarken,

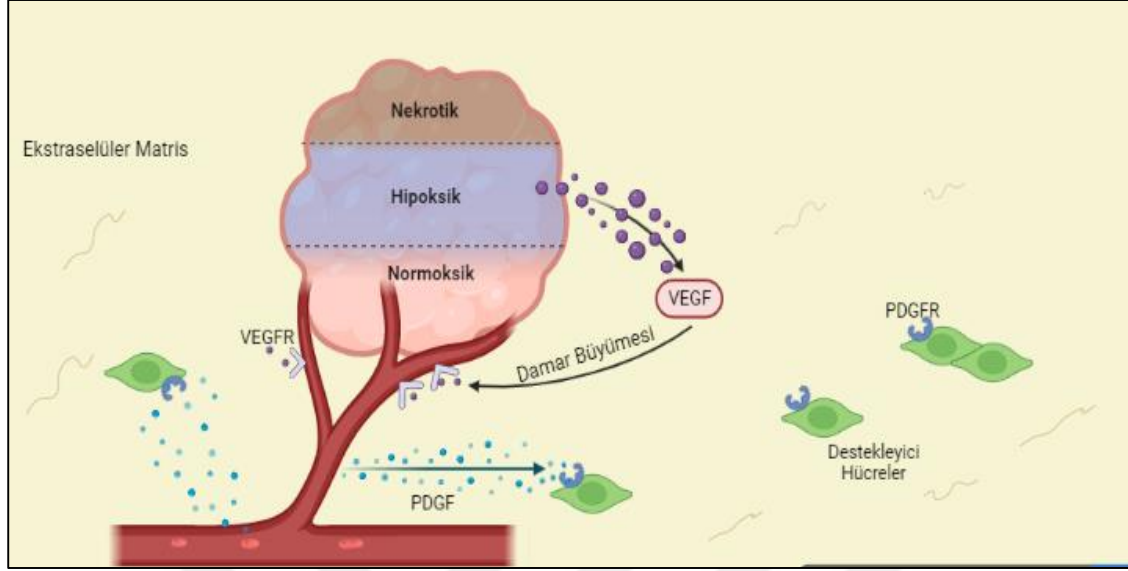
tümör gelişimi hız kazanır. Temelinde endotel hücrelerinin görev aldığı anjiogenezde sitokinler, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri rol alır. Anjiogenez hipoksi ile başlar ve sonucunda tümör büyümesi devam eder. Tümör büyüdükçe hipoksi artar ve anjiogenez yeniden tetiklenir. Hipoksi gelişip anjiogenez tetiklendikten sonra aktive edici faktörler artarken inhibitör faktörler ise azalır (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Anjiogenezde rol alan aktivatör ve inhibitör faktörler (Cook ve Figg, 2010).

Aktivatör Mediyatörler	İnhibitör Mediyatörler
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	Trombospondin
Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- α/β)	TNF- α/β
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Endostatin
Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)	VEGF inhibitörü
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Angiostatin

Tümöral anjiyogenez, fizyolojik anjiyogenezin aksine sınırlı değildir. Tümör mikroçevresinde, normal dokulardaki arter, ven, kapiller yapısına ek olarak arteriövenöz şantlar gelişir. Dolayısıyla tümörün mikro damar yapısı heterojendir ve normal dokulardaki anjiogenezden farklıdır.

VEGF ile indüklenen kan damarlarının sızdırma kapasitesi vardır. Fibrinojen gibi VEGF ile indüklenen plazma proteinleri yeni şekillenmiş damarlardan ekstrasellüler matrikse sızar ve tümörün etrafında jelimsi bir yapı oluşturur. Bu jelde bulunan VEGF angiogenezi daha da ilerleterek devamlılığını sağlar (Ziyad ve Iruela- Artispe, 2011).



Şekil 1.2. Tümör mikroçevresinde anjiyogenez mekanizması (King vd., 2021'den tasarlanarak çizilmiştir).

Progresyon ve Heterojenite: Progresyon, gelişen tümörlerin zaman ile birlikte daha agresif bir role bürünerek malignite potansiyelinin artmasıdır. Büyüme hızla artar, ekstrasellüler matriks ve damar invazyon yeteneği kazanılan ilk aşama bu dönemde gerçekleşebilir. Progresyon ve heterojenitenin altında yatan temel neden, başlangıçta monoklonal yapıda olan tümör hücrelerinden farklı genetik yapıda alt grupların oluşmasıdır. Yani genetik olarak stabil olmayan çok sayıda farklı hücrelerin proliferasyonu şekillenir (Karaağaç, 2006).

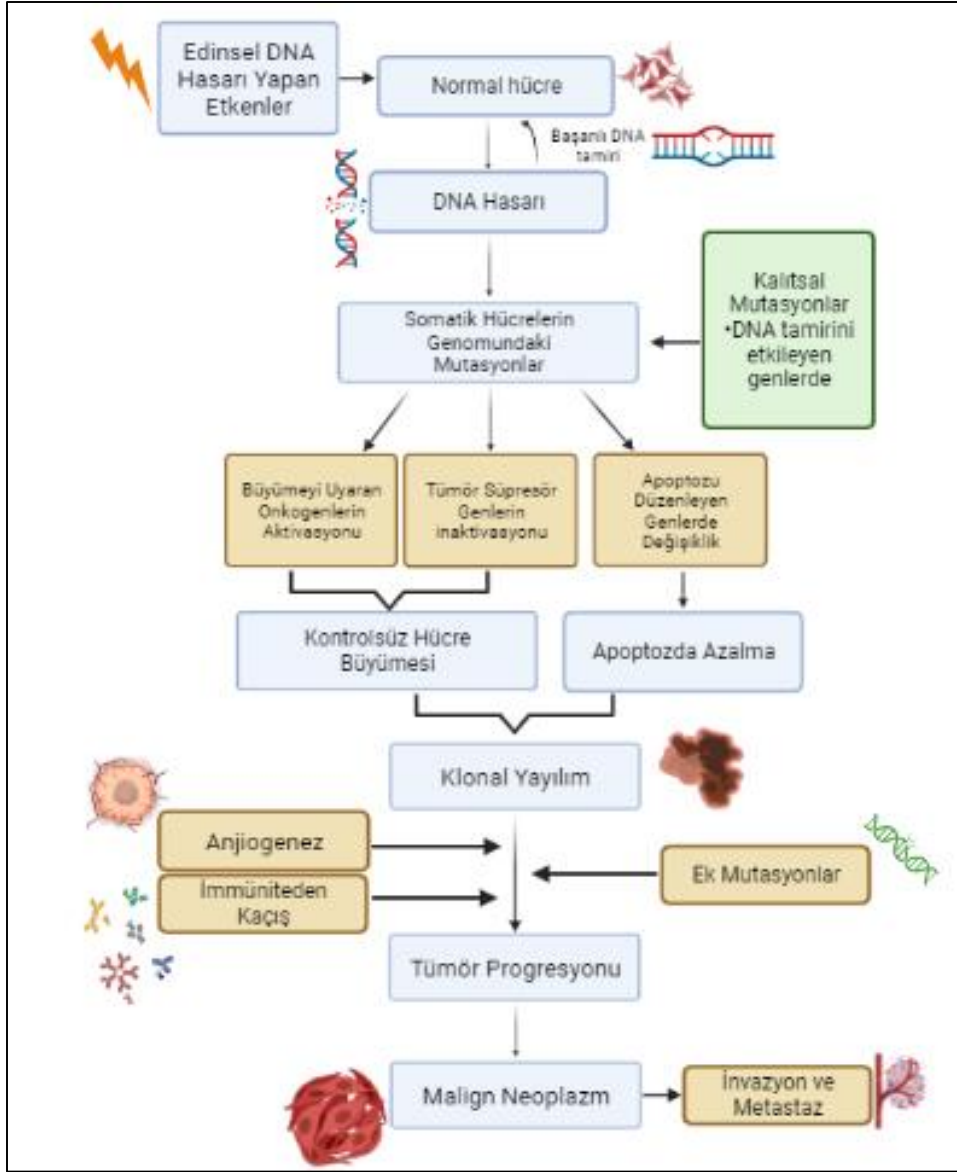
Ekstrasellüler Matriks İnvazyonu: Birbirlerine yapışık halde bulunan tümör hücreleri birbirinden ayrılır ve matriks bileşenlerine yapışırlar. Ekstrasellüler matriks yıkımları ve tümör hücrelerinin migrasyonu gerçekleşir (Apakkan, 2001).

Disseminasyon ve Yakın/Uzak Bölgelere Yayılma (Metastaz): Metastaz, kanser hücrelerinin kanserin başladığı primer odak bölgesinden daha uzak organ ve dokulara yayılmasını ifade eder. Metastaz oluşumunda başlıca aşağıda açıklanan süreçler yer alır;

- a) hücre adezyonunda azalma ve tümör hücrelerinin tümör kitlesinden ayrılması,
- b) kan damarı ve/veya lenfatik invazyonu,
- c) dolaşımda immun sistemden kaçış,

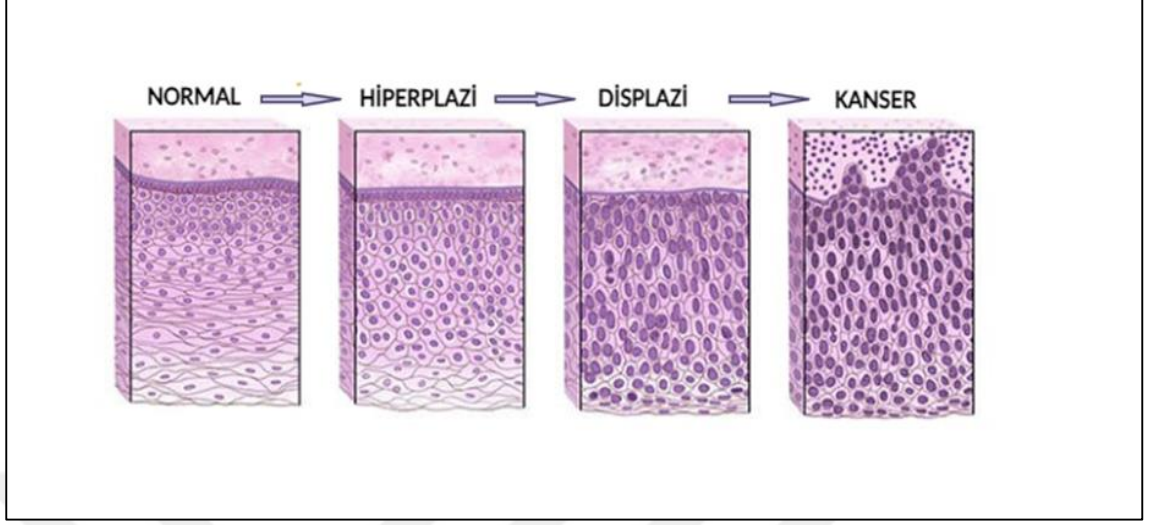
- d) damar endotel hücrelerine adezyon,
- e) kan damarı veya lenfatiklerden ekstravazasyon,
- f) proliferasyon ve anjiogenez (Yıldırım, 2017).

Tümör hücreleri dolaşıma girdikten sonra ilk olarak bağışıklık sistemi hücreleriyle karşılaşır ve bir kısım tümör hücresi burada yok edilir. Kalan diğer bir kısım, lökositler ve trombositler ile birleşerek tümör embolisine sebep olur. Bu hücreler bağışıklık sistemi savunmasından kolayca kaçabilirler. Bu tümör embolisi damarın bazal membranına yapışır ve damar dışına çıkarak metastatik odak oluşturma kapasitesine sahiptir. İntravazasyon ve ekstravazasyonun nerede oluşacağını, primer tümör odağının bulunduğu bölgedeki damarlar ve lenfatikler belirler (Langley ve Fidler, 2007).



Şekil 1.3. Karsinogenezin şematik gösterimi. Vücuttaki herhangi bir somatik hücrenin klonal yayılım ile aynı genetik materyale sahip başka hücreler üretmesi (Anonim 2023b den tasarlanarak çizilmiştir).

Kanser, başlangıç fazı olan indüksiyon aşamasını tamamlamış olsa bile, çoğunlukla klinikte farkedilebilecek bir bulguya rastlanamaz ve rastlantısal tarama testlerinde ortaya çıkar. İndüksiyon fazında kanser gelişimini tamamlanmış olsa bile, henüz metastaz yapmadığı için tedavi şansı oldukça yüksektir (Klein, 2020).



Şekil 1.4. Hiperplazi/displazi/kanser progresyonu. (Anonim, 2023c).

Dokularda kanser hücreleri gelişmeden önce, hücreler ilk olarak hiperplazi ve displazi adı verilen anormal değişikliklere uğrar. Hiperplazide, hormon veya diğer büyüme faktörleri uyarısına cevap olarak, genetik mutasyona uğramış hücre sayısı artar fakat mikroskopik olarak bu hücreler normal fenotip gösterirler. Displazide aşırı proliferasyonla birlikte, hücrelerin morfolojisi heterojenite kazanır, nükleus konumu ve polarizasyonu değişir, bu aşama prekanseröz yapılar olarak nitelendirilir (Kanwal, 2013).

1.1.3. Kanser ve Yangı İlişkisi

Kanser gelişiminin başlangıç evresini takiben gelişen yangı, ilgili metabolitlerin salınımıyla kanserin gelişmesine yanıt verir. Oluşan yanıt kanserin gelişiminin artmasını ve azalmasını düzenler. COX-2 ifadesi yaygın olarak premalign lezyonlar (displazi ve atipi), invazif ve özellikle metastatik kanserlerde bulunur. Artmış COX-2 ifadesinin, apoptozu inhibe ettiği, hücre bölünmesini uyardığı, hücre yapışmasını değiştirerek ve neovaskülarizasyon ile metastazı arttırarak antitümör bağışıklık tepkilerini ve hücre protein sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Harris vd., 2014).

Kanserle ilişkili inflamasyondan sorumlu hücreler genetik olarak stabildir ve bu nedenle ilaç direncinin geç şekillenmesiyle, yangının hedeflenmesi hem kanserin önlenmesinde hem de tedavisinde cazip bir stratejiyi temsil eder (Coussens ve Werb, 2002).

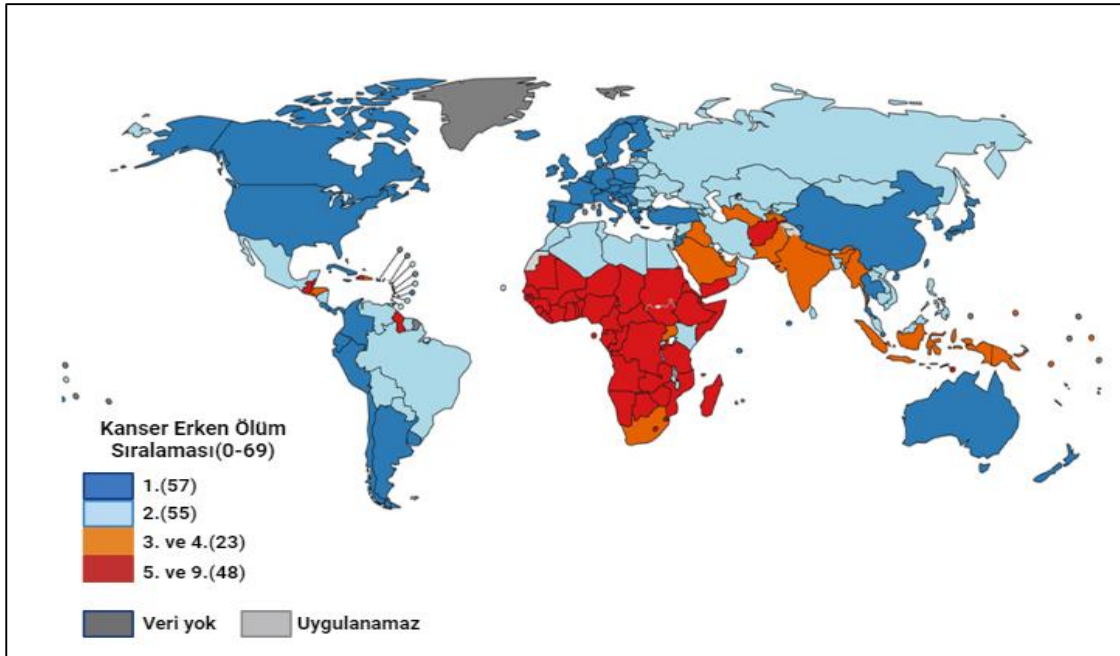
1.1.3.1. COX-2 İfadesi

Meme, kolon, osteosarkom, mide kanseri, servikal kanser, oral yassı hücreli kanser, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi birçok kanser türü siklooksijenaz (COX) aktivitesine sahiptir ve siklooksijenaz aktivitesindeki artış kötü prognoz ve düşük hayatta kalma oranları ile paralellik göstermektedir (Carvalho vd., 2016). Tümör hücrelerinin COX aktivitesinin, in-vivo vaskülarizasyon ve fibrozis oluşumunu artırdığı, apoptozu inhibe ettiği, metastaz ve yeni damar oluşumu ve gelişimini desteklediği, ayrıca tümör gelişiminde anahtar rolü olan Prostaglandin E2 (PGE2) oluşumunu yukarı regüle ederek, bir şekilde immün sistemin baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Lavalle vd., 2009; Dore, 2011). Çalışmalarda PG'lerin sitokinlerle çapraz reaksiyona girerek çeşitli enflamatuar hücreler üzerindeki sitokin etkilerini artırdığı ve gen ifadesini düzenleyerek hücrelerde metaplaziye neden olduğu gösterilmiştir (Aoki ve Narumiya, 2012; Yao ve Narumiya, 2019).

COX'un siklooksijenaz-1 (COX-1), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve siklooksijenaz-3 (COX-3) olmak üzere 3 farklı izoformu olduğu bilinmektedir (Shama vd., 2003; Pang LY vd., 2016). COX-1 çoğu dokuda yapısal olarak bulunur ve esas olarak vücuttaki homeostatik fonksiyonların düzenlenmesinde yer alır. COX-1b veya COX-1v olarak da adlandırılan COX-1'in bir ek varyantı olan COX-3, en çok köpek serebral korteksinde bulunur, ancak ayrıntılı işlevi belirsizliğini korumaktadır (Pu vd., 2021). COX-2 tarafından oluşturulan PG'ler, özellikle ağrı ve yangıya aracılık eder (Adelizzi, 1999). COX-2 ifadesi, karsinom oluşumu, indüksiyonu, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişiminde pleiotropik ve çok yönlü bir rol oynar. COX-2, kanserle ilişkili fibroblastlar, makrofaj tip 2 (M2) hücreleri ve kanser hücreleri tarafından tümör mikroçevresine salgınır (Goradel vd., 2019). Çoklu sinyaller, COX-2'nin kanser hücreleri üzerindeki işlevlerine veya düzenlenmesine katkıda bulunur. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesinin üyeleri, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve Nükleer Faktör- $\kappa\beta$, kanser hücrelerinde COX-2 ifadesini artıran başlıca modülatörlerdir. Esasen, PG'ler ve sitokinler, NF- $\kappa\beta$ 'yi sinerjistik olarak aktive ederek PG aracılı pozitif geri besleme döngüleri oluşturur. Sonuç olarak, bu sinyal, yangıyla ilişkili genlerin ifadesini indüklemek için makrofajlar ve nötrofillerde çeşitli NF- $\kappa\beta$ aracılı genlerin ifadesini artırır ve bu hücrelerin sürekli infiltrasyonuna neden olur (Yao ve Narumia, 2019).

1.1.4. Türkiye ve Dünyada Kanser Epidemiyolojisi

Kanser, yüzyıl önce bu kadar yaygın olmamakla birlikte, değişen yaşam tarzı, alışkanlıklar ve artan yaşam süreleri sebebiyle kanser olguları, ölüm sebepleri arasında kardiovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir (Roy vd., 2016) Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) 'nin yaptığı son güncellemeler ışığında dünya çapında 2020 yılında 19,3 milyon kanser olgusu ve 10 milyon insanın kanserden dolayı öldüğü bilinmektedir. Endişe verici şekildeki son 25 yılda artan kanser insidansı IARC tarafından, dünyada, 5 kişiden birinin kansere yakalandığı ve 8 erkekten 1'inin ve 11 kadından 1'inin hastalıktan öldüğünü göstermektedir. Bu yeni tahminler, 50 milyondan fazla insanın kanser teşhisinden sonra ortalama beş yıl yaşadığını göstermektedir (Sung vd., 2021). Küresel olarak yaşanan nüfus ve sosyo-ekonomik risk faktörleri, bu artışı yönlendiren başlıca faktörler arasında yer almaktadır (Bray ve Moller, 2006). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 verilerine göre, kanser 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş altı ölüm sebepleri arasında birinci veya ikinci, 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.5.) (Sung vd., 2021).



Şekil 1.5. Dünya kanser istatistikleri (<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660> adresinden alınmıştır).

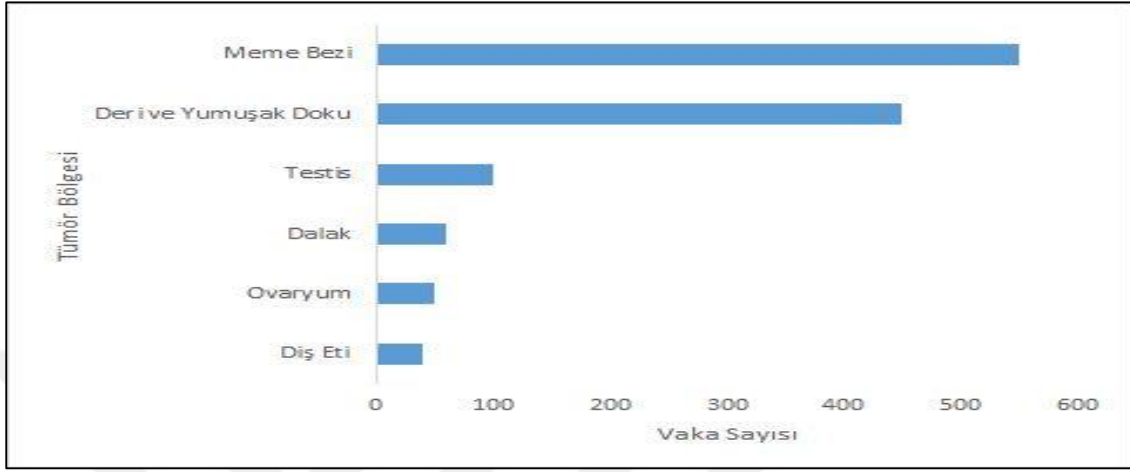
Türkiye’de artan nüfusa paralel olarak yeni kanser teşhisi alan hasta sayısı da artmaktadır. 2020 yılında yapılan son güncellemeler ile Türkiye nüfusu 84.339.067 iken, yıllık yeni kanser olgu sayısı 233.834 ve kanserden dolayı hayatını kaybedenlerin sayısı 126.335 olarak belirlenmiştir. Türkiye’de erkek popülasyonunda kanser görülme sıklığı kadınlara göre yüksektir. Ülkemizde, 75 yaş öncesi her 4 kişiden birine kanser teşhisi konulduğu raporlanmıştır (Çizelge 1.3.).

Çizelge 1.3. Türkiye Kanser İstatistikleri (Anonim, 2023d).

	Erkekler	Kadınlar	Her iki cinsiyet
Toplum	41.636.125	42.702.942	84.339.067
Yeni vaka sayısı	132.816	101.018	233.834
Yaşa göre standardize edilmiş 100 bin kişide yeni vaka sayısı	291,5	188,0	213,5
75 yaşından önce kanser geliştirme riski (%)	29,2	18,4	23,3
Kansere bağlı yaşam kayıplarının sayısı	78.949	47.386	126.335
Yaşa göre standardize edilmiş 100 bin kişide yıllık yeni kanser ölümü sayısı	171,6	81,4	120,4
75 yaşından önce kansere bağlı yaşam kaybı riski (%)	18,2	8,6	13,0
5 yıllık aktif vaka sayısı	300.071	281.565	581.636
Melenom dışı cilt kanseri hariç en sık görülen 5 kanser	Akciğer Prostat Kolorektal Mesane Mide	Meme Troid Kolorektal Akciğer Rahim	Akciğer Meme Kolorektal Prostat Troid

Tüm dünyada köpeklerin en önemli morbitite ve mortalite nedeninin başında kanser gelmektedir. Bunun temel nedeni insanlarda olduğu gibi bu türlerde de hayatta kalma süresindeki artıştır. Her yıl yaklaşık yaklaşık 6 milyondan fazla kedi ve köpekte kanser teşhis edilmektedir (Hansen ve Khanna, 2004). Köpekler insanlarda oluşan kanserlerin çoğuna karşı yatkınlık gösterirler, köpekler prostat ve meme kanseri için spontan insan modeli oluşturur. 2001-2008 yılları arasında Piedmont Canine Cancer Registry tarafından yapılan bir papülasyon araştırmasında, histolojik olarak doğrulanmış 1175 vaka bildirilmiştir. Yıl boyunca gözlenen her 100,000 köpek için kötü huylu tümör insidansı

804, iyi huylu tümör insidansı ise 897 olarak raporlanmış ve olguların lokalizasyonu detaylı olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.6.) (Baioni vd., 2017).



Şekil 1.6. Köpeklerde tümör bölgesine göre vaka sayısı (Baioni vd., 2017).

Epidemiyolojik çalışmalar, köpeklerde en sık görülen tümörlerin deride oluştuğunu, bunu meme bezi, hematopoyetik sistem ve yumuşak dokuların takip ettiğini göstermektedir (Brønden ve diğerleri, 2010; Fleming vd., 2011; Grüntzig vd., 2016). Yaş, cins ve cinsiyet gibi hayvan özelliklerinin, bireyde tümörün büyümesini tetiklemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Labrador, Boxer, Golden Retriever, Rottweiller gibi bazı ırkların kansere genetik yatkınlığı bulunmaktadır (Dobson, 2013). Her yaşta bireyde tümör gelişebilmekle birlikte, uzun ömürlü hayvanlarda belirgin bir yatkınlık bulunduğu ve bunun kansere yol açan genetik mutasyonların ilerleyici birikimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Reif, 2007).

Meksika'da 2002-2016 yılları arasında yapılan bir diğer çalışmada, laboratuvarında histopatolojik yöntemlerle tanı konulan 393 tümör incelenmiştir. En sık deri tümörleri (%59,0), bunu üreme sistemi (%16,3), meme bezi (%12,5), sindirim sistemi (%4,6), lenfoid doku (%3,6), iskelet-kas (%2,5), solunum yolu (%1,3) ve endokrin tümörler (%0,2) izlenmektedir (Garcia-Aranda ve Rodendo, 2019).

1.2. Meme Tümörleri

Tarih boyunca bütün uygarlıklarda kanser tanımlanmasına ve tedavi şekline ilişkin birçok bilgi bulunmaktadır. Bunların bir örneği de Galen'in milattan sonra 131-200 yıllında "kanserli tümörler en sık olarak kadınların memelerinde gelişmektedir" şeklinde tarihe düştüğü nottur. Günümüzde, tüm dünyada, her sekiz kadından birinde meme kanseri görülmektedir (DeSantis vd., 2016, Akınoğlu vd., 2002). Meme kanseri, kişi başına düşen gelire bakılmaksızın melanom dışı cilt kanserinden sonra tüm dünyada ve Türkiye'de kadınlarda gelişen en yaygın kanser olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin neredeyse %32'sini oluşturmaktadır (Sopik vd., 2018, Parkin vd 2002, Koçak 2000). Kansere bağlı şekillenen ölümlerin ise %18'nin meme kanserinden kaynaklandığı raporlanmıştır (Ferlay vd., 2015; DeSantis, 2015). Türkiye'de 2020 yılı verilerine göre ise meme kanseri, kadınların kanserden dolayı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Özkan vd., 2014).

Meme kanseri, memenin süt üreten bezlerinde veya süt kanallarında bulunan epitel hücrelerinin anormal şekilde kontrolsüzce çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Normal meme dokusu gelişiminde progesteron, östrojen, androjen ve tiroid hormonları, Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF) ve Epidermal Büyüme Faktörleri (EGF) rol almaktadır. Normal meme gelişimine katkı sağlayan bu etkiler, bazı genlerin ifade seviyelerinin artırıp azaltarak kontrolü sağlarlar ve hem normal meme dokusunun gelişimine hem de memede normal hücrelerin malign karakter kazanmasında rol alırlar.

1.2.1. Köpek Meme Tümörleri

Köpek meme tümörlerinin sınıflandırılmasında histogenez, morfoloji ve prognoz olmak üzere temel üç özellik kullanılmaktadır (Hellmen, 1996).

Histogenetik olarak yapılan sınıflandırma, tümörleri şekillendiren hücre fenotiplerinin kesin ayrımının zorluğu, miks tümörlerde epitel hücre katılımına dair farklı görüşlerden dolayı fazla tercih edilmemektedir. Yine köpek meme tümörlerinde gözlenen mezenşimal dokunun heterojen non-neoplastik kökenli olduğuna dair görüşler de bulunmaktadır (Moulton, 1990).

Çalışmalarda en çok kullanılan ve morfolojiyi tanımlayan Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun sınıflandırmasında; epitel kökenli tümörler, myoepitel hücrelerin tümöre katılıp katılmamasına göre simple ya da kompleks olarak adlandırılır. Karsinom ve malign karakterli mezenşimal tümörler ise histopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Hampe ve Misdorp, 1974).

Çizelge 1.4. WHO köpek meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması (Misdorp et al., 1999).

1. Malign Tümörler

- 1.1. İn-situ karsinom
- 1.2. Kompleks karsinom
- 1.3. Simple Karsinom
 - 1.3.1. Tubulopapiller Karsinom
 - 1.3.2. Solid Karsinom
 - 1.3.3. Anaplastik Karsinom
- 1.4. Karsinomların Özel Tipleri
 - 1.4.1. Mekik Hücreli Karsinom
 - 1.4.2. Yassı Hücreli Karsinom
 - 1.4.3. Müsinöz Karsinom
 - 1.4.4. Yağ Hücreli Karsinom
- 1.5. Sarkoma
 - 1.5.1. Fibrosarkom
 - 1.5.2. Osteosarkom
 - 1.5.3. Diğer Sarkomalar
- 1.6. Karsinosarkom
- 1.7. Benign Tümörlerde Karsinom ya da Sarkom

2. Bening Tümörler

- 2.1. Adenom
 - 2.2. Fibroadenom
 - 2.3. Benign Miks Tümörler
 - 2.4. Duktal Papillom
-

3.Sınıflandırılmayan Tümörler

4. Meme Hiperplazileri

- 4.1. Duktal Hiperplazi
- 4.2. Lobular hiperplazi
 - 4.2.1. Epitelyal Hiperplazi
 - 4.2.2. Adenozis
- 4.3. Kistler
- 4.4. Duktal Ektazi
- 4.5. Fibrosklerosis
- 4.6. Jinekomasti

Köpeklerin meme bezindeki neoplastik değişikliklerin sınıflandırılmasına ilişkin çok sayıda veri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, morfolojik tanı yaklaşımına göre yapılan sınıflandırma halen tartışma konusudur (Thike vd., 2019). Ancak, David Thompson Vakfı'nın uluslararası sınıflandırması en çok başvurulan kaynaktır.

Çizelge 1.5. Davis Thompson Vakfı ICD-O3.2 kodlu köpek meme tümörleri sınıflandırması (Zappulli vd., 2019).

Lezyon	ICD-O-3.2 kodu	Kategori
1. Hiperplazi		
1.1 Duktal ektazi	NA	H
1.2 Lobüler Hiperplazi		
1.2.1. Regüler	NA	H
1.2.2. Salgı Aktivitesi	NA	H
1.2.3 Fibrozis	NA	H
1.2.4. Atipi	NA	H
1.3. Epitelyal	NA	H
1.4. Papillomatoz	8060/0	H
2. Benign Epitelyal Neoplazi		
2.1. Basit iyi huylu tümör		
2.1.1. Adenom	8211/0	B
2.1.2. Miyoepitelyom	8982/0	B
2.2. Basit olmayan iyi huylu tümörler		
2.2.1. Kompleks Adenom	8983/0	B
2.2.2. Benign miks tümör	8940/0	B
2.2.3. Fibroadenom	9010/0	B
2.3 Duktal ilişkili benign tümörler		
2.3.1. Duktal adenom	8147/0	B
2.3.2. İntraduktal papiller adenom	8503/0	B
3. Malign neoplazm		
3.1. Karsinom		
3.2. Basit karsinom		
3.2.1. Tubüler karsinom	8211/3	M
3.2.2. Tubülopapiller karsinom	8263/3	M
3.2.3. Solid karsinom	8230/3	M
3.2.4. İnvaziv mikropapiller karsinom	8507/3	M
3.2.5. Komedokarsinom	8501/3	M
3.2.6. Anaplastik karsinom	8021/3	M
3.3. Basit olmayan Karsinom		
3.3.1. Kompleks adenomda ortaya çıkan karsinom/benign miks tümörler	8941/3	M
3.3.2. Kompleks karsinom	8983/3	M
3.3.3. Karsinom ve malign miyoepitelyom	8562/3	M
3.3.4. Miks karsinom	8940/3	M
3.4. Duktal ilişkili karsinom		
3.4.1. Duktal karsinom	8147/3	M
3.4.2. İntraduktal papillar karsinom	8503/3	M
4. Malignant epitelyal neoplazi		
4.1. Skuamöz hücreli karsinom	8070/3	M
4.2. Adenoskuamöz karsinom	8560/3	M
4.3. Musinöz karsinom	8480/3	M
4.4. Lipid-zengin karsinom	8314/3	M
4.5. Spindle hücreli karsinom	8572/3	M
4.6. Malign miyoepitelyom	8982/3	M
5. Malign mezenşimal neoplazi		
5.1. Osteosarkom	9180/3	M
5.2. Kondrosarkom	9220/3	M
5.3. Fibrosarkom	8810/3	M
5.4. Hemangiyosarkom	9120/3	M
5.5. Diğer sarkomlar	8800/3	M
6. Karsinosarkom	8980/3	M

7. Meme başı hiperplazi/dispilazisi		
7.1 Meme başı derisi melanozisi	NA	H
7.2 Meme başı hiperplazisi	NA	H
8. Meme Başı Neoplazisi		
8.1 Benign duktal-ilişkili neoplazi		
8.1.1. Duktal adenom	8147/0	B
8.1.2. İntraduktal papillar adenom	8503/0	B
8.2. Malign duktal-ilişkili neoplazi		
8.2.1. Duktal karsinom	8147/3	M
8.2.2. İntraduktal papillar karsinom	8503/3	M
8.3. Epidermoid Karsinom	8540/3	M

Not: NA, uygun değil; H, hiperplazi/dysplasia; B, Benign tümör; M, malign tümör.

1.2.2. Köpek Meme Tümörü Çalışmaları

1.2.2.1. İn vivo Çalışmalar

Kanserin patogenezi, hücrel mutasyon özelliklerini ve tedavi ajanlarını araştırmak için birçok in vivo deneysel modeller kullanılmaktadır. İn vivo deneysel kanser modelleri olarak, model organizmalar (maya, sirke sineği, nematod, kurbağa, zebra balığı), küçük memeli kanser modeli hayvanlar (fare, sıçan, tavşan) ve büyük memeli kanser hayvan modelleri (köpek, domuz, primatlar) sıklıkla kullanılmaktadır. Köpeklerde doğal olarak ortaya çıkan kanserlerin incelenmesi, diğer deneysel kanser modellerine göre klinik, histolojik özellikler, moleküler profiller, tedaviye yanıt ve direncin yanı sıra metastaz oluşumu yönünden insanlardaki tümör metabolizmasını daha yakından yansıtmaktadır (Gardner vd., 2016).

Köpeklerde spontan gelişen köpek meme tümörleriyle insan meme tümörleri arasında hormonal etiyoloji, başlangıç yaşı ve hastalık seyri açısından ciddi benzerlikler bulunmaktadır. Ayrıca, tümör boyutu, evresi ve lenf nodu metastazı gibi hastalığın gidişatını belirleyen faktörler arasındada benzerlikler gösterilmiştir (Queiroga vd., 2011).

1.2.2.2. İn vitro Çalışmalar

In vitro deneysel tümör modelleri, kanserojenlerin tanımlanması, tümör proliferasyonunun incelenmesi, metastazının moleküler mekanizmasının araştırılması ve ilaç geliştirme çalışmaları için düşük maliyetli bir deneysel kanser modelidir. Ayrıca, kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri veya hastalık yayılımının gerçek zamanlı olarak izlenmesi ve hastalara etkili tedaviler sağlanması için araç görevi görürler. İn vitro

deneysel kanser modellerinde 2D modellerden 3D platformlara taşınması ve çeşitli in vitro kanser mekanizmalarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Kanser ilerleyişi ve tedavisinin daha iyi anlaşılabilmesi için oluşturulan deneysel in vitro tümör modelleri proliferasyon, invazyon ve sitotoksikite taramalarının yanı sıra intravazasyon, ekstrasvazasyon, anjiyogenez, yeniden matris şekillenmesi gibi geliştirilmiş 3D in vitro kanser modelleriyle kanser çalışmalarına temel oluşturmaktadır (Katt vd., 2016).

a) CMT-U27

CMT-U27 (duktal invaziv karsinom) hücre hattı, 14 yaşlı dişi bir köpeğin memesinden izole edilen epitel veya mioepitel hücre morfolojisi gösteren tek bir hücre tipinden oluşan hücre hattıdır. Bu hücre hattı, meme karsinomları ile ilgili çalışmaların yanı sıra meme tümörlerinin karşılaştırmalı in vitro çalışmaları ve veteriner onkoloji alanında ilaçların prelinik testleri için kullanılmaktadır. Düşük oranda sitokeratin, vimentin ve düz kas aktin filamentlerini ekspres eder. CMT-U27 hücre hattı %25 oranında progesteron ekspres eder, ancak östrojen ekspres etmezler (Hellmen, 1992).

b) CMT-U309

İğsi hücreli karsinomu temsil eden CMT-U309 hücre hattı 11 yaşlı dişi Newfoundland ırkı köpeğin iğsi hücre tümörlerinden ve osteosarkomlardan elde edilen hücre hattıdır. Bu hücre hattı, pluripotent bir meme kök hücre orijinini gösterir. Memenin iğsi hücreli karsinomları tipik olarak, epitelyal tip hücrelerden çok mezenkimale benzeyen ve meme tümörlerinin nadir ve agresif alt tipleri olan uzunlamasına hücre kümeleri içerir. İğ-hücre tümörlerinden alınan hücreler, sitokeratin, vimentin ve düz kas aktin filamentlerini ekspres eder. Bu hücre hattının progesteron reseptörleri vardır, ancak östrojen reseptörleri yoktur (Hellmen, 2000).

c) P114

P114 hücre hattı oldukça malign bir köpek primer anaplastik karsinomundan izole edilmiştir ve agresif tip p53 taşıdığı bildirilmiştir. Bu hücre dizisi, meme karsinomları ile ilgili çalışmaların yanı sıra meme tümörlerinin karşılaştırmalı in vitro çalışmaları ve veteriner onkolojisine yönelik ilaçların prelinik testleri için kullanılmaktadır (Van Leeuwen ve ark. 1996).

d) MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre hattı, 51 yaşındaki kadın bir hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Hem östrojen ve progesteron reseptörü hem de HER2 amplifikasyonu negatif olduğu için invaziv ve zayıf farklılaşmış 'bazal' benzeri meme kanseri alt tipi olarak tanımlanmıştır. Fakat klaudin-3 ve klaudin-4'ün down regülasyonunu sergilediği için 'klaudin-düşük' moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmiştir (Holliday ve Speirs, 2011).

1.3. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinde tedavi protokollerine her geçen gün yenisi eklense de genellikle operatif sağaltım, ışın, kemoterapi ve hormon tedavisi, kemik iliği ve kök hücre transplantasyonu gibi yöntemlerin tek başlarına ya da kombinasyonlu seçenekleri uygulanmaktadır (Lewis vd., 2004). Uygulanan tüm bu tedavi stratejilerindeki temel amaç, hastanın kanseri yenebilmesi, bölgesel kontrolün sağlanması, tekrar nükslerin engellenmesi, evrelemenin yapılarak doğru tedaviyle hasta refahının sağlanmasıdır (Kalaycı, 2002).

En yüksek maliyetli hastalık tedavileri arasında yer alan kanser tedavisi için yapılan harcamalar tüm dünyada sağlık harcamalarının ikinci sırasında yer alarak önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Meme kanseri tedavisi ise toplam sağlık harcamaların %18.2'sini kapsayan büyük bir paya sahiptir (Bosanquet ve Sikora 2004).

1.3.1. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

1.3.1.1. Lokal Tedavi

Meme kanserinde cerrahi tedavinin yapılabilmesi için erken evre meme kanseri (Evre I-II) döneminde olması gerekmektedir. Bu hastaların cerrahi tedavi şeklinin seçimi yapılırken, kanserin boyutu ve yerleşim yeri, memenin hangi bölgesinde yerleştiği, mammografi sonuçları, kişinin meme büyüklüğü, uygun cerrahi ve radyoterapi seçenekleri ve kişiye özel faktörler dikkate alınmaktadır. Yapılan bu değerlendirmeler sonucunda; meme koruyucu cerrahi (sadece kanserli alanın çıkarılması), total mastektomi ya da radikal mastektomi yöntemlerinden hasta için uygun olanı seçilmekte ve sonrasında tedavi radyoterapi ve kemoterapi ile desteklenmektedir (Karabacak, 2004). Meme

kanserinin cerrahi tedavisinde hala sıklıkla yapılmakta olan mastektomi, memede birden daha fazla sayıda tümör kitlesi geliştiğinde, özellikle multifokal hastalıkta, memenin boyutu ile orantılı gelişmiş büyük bir tümör varlığında, herhangi bir kollajen doku hastalığı öyküsü olduğunda ve kişinin bu cerrahi yöntemi tercih ettiğinde yapılmaktadır (Küçük, 2003).

1.3.1.2. Cerrahi Tedavi ve Radyoterapi

Radyoterapi olarak adlandırılan radyasyon tedavisi kanser hücrelerini yok etmek ve tümör kitlelerini küçültmek amacıyla yüksek frekansa sahip mor ötesi X ışınların ya da atom partiküllerinin kanserli dokuya yoğun şekilde uygulandığı tedavi yöntemidir. Hücrenin DNA'sını harabiyete uğratarak ya da tamamen yok ederek hücrelerin bölünüp çoğalmalarını engellemektedir. Meme kanseri tedavisinin ayrılmaz bir parçası olan radyoterapi, cerrahi tedaviden önce veya sonra uygulanmaktadır (Anonim, 2023e). Radyoterapideki amaç tıpkı cerrahi yöntemlerde olduğu gibi ilk öncelikle tümör kitlesinin bulunduğu çevrede kontrolü sağlamak ve buna bağlı olarak yaşam süresini artırmaktır. Cerrahi operasyon sonrası uygulanan radyoterapinin %65-75 oranında nüksleri azalttığı ve mortaliteyi de % 9 oranında düşürdüğü görülmüştür. Radyoterapinin hedefleri;

- Birincil (primer) tedavi olarak kanseri tamamen yok edebilmek veya cerrahi operasyon sonrasında tekrar gelişmesini engellemek,
- Opere edilemeyecek boyuttaki tümörleri küçülterek opere edilebilir boyuta getirmek,
- Metastazlar ve bölgesel nüksler sonucunda oluşan ağrı gibi yan etkileri azaltmak yada yok etmektir (Lewis vd., 2004).

Çeşitli ışın teknikleriyle, birden fazla ışın demetinin tümör kitlesinde kesiştirilmesi yoluyla tümör dokusu, çevresindeki dokulara kıyasla çok daha fazla ışını absorbe eder ve tümörde normal dokulara oranla daha fazla hasar oluşur.

1.3.1.3. Kemoterapi

Kemoterapinin amacı, hücre proliferasyonundaki artış ve tümörün büyümesi engellenerek invazyon ve metastazdan kaçınmaktır. Kemoterapi, aynı zamanda vücudun normal

hücrelerine de zarar verdiğiinden toksisite ve hasarı gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Konvansiyonel kemoterapötik ajanlar, özellikle DNA, RNA veya protein sentezine etki ederek ya da önceden oluşturulmuş molekülün işleyişini etkileyerek tümör hücrelerinin makromoleküler sentezini ve işlevini bozarlar. Uygulanan kemoterapötik ilaçlar çalışmaya başlayıp molekül sentez veya fonksiyona müdahale için yeterli seviyeye ulaştığında, doğrudan veya dolaylı olarak apoptozu tetikler ve hücre ölümüne yol açar.

Kemoterapötik ajanlar, etki mekanizmasına göre sınıflandırılabilir:

a. Alkalileştiriciler

Nitrojen Mustard grubu; siklofosamid, bendamustin, klorambusil, ifosfamid.

Nitrozürelere; karmustin, streptozotosin, lomustin.

Platin analogları; karboplatin, sisplatin, oksaliplatin.

Triazenler- Dakarbazin, prokarbazin, temozolomid.

Alkil sülfonatlar; busülfan.

Etileniminler; Alteramin, Tiotepa.

Bu ilaçlar, birçok organik bileşiklerle reaksiyon gösteren proteinler ve nükleik asitler üzerindeki nükleofilik merkezlere etki eden kararsız bir alkil grubudur. Temelde DNA'nın alkillenmesi sonucunda toksik etkiler oluşur. Alkilenen DNA'nın onarımında rol alan enzimler DNA'da hasar oluşturur ve bu hasarı tamir edemez. Sonuç olarak DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu inhibe eder (Cengiz vd., 2018).

• Siklofosamidin antikanser etkinlikteki rolü

Siklofosamid kemoterapötik olarak kullanımın yanı sıra immun sistemi baskılamak için de kullanılan sitotoksik bir ilaçtır. Kanser tedavisinde lösemi, multiple myelom, ovaryum kanseri ve meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılır. Ayrıca bir immunsupresif olarak kemik iliği transplantasyonu, nefrotik sendrom ve organ naklini takiben kullanılır.

Siklofosamid'in antikanserojenik aktivitesi metabolit ürünlerinden kaynaklanmaktadır. Siklofosamid hepatik sitokrom P-450 sistemiyle, 4-hidroksi siklofosamide dönüşür. Sonrasında enzimatik olmayan reaksiyonlarla fosforamid mustard (FAM) ve akroleine

ayrılırlar. Elde edilen FAM' ın hücre büyümesini baskılayarak antikanserejonek etki gösterdiği düşünölmektedir (Bayramoğlu, 2007).

b. Antibiyotikler

Kemoterapi ajanı olarak kullanılan antibiyotikler antrasiklinler ve antrasiklin dışındakiler olarak sınıflandırılabilirler.

Antrasiklinler; doksorubisin, daunorubisin ve idarubisin.

• Doksorubisinin antikanser etkinlikteki rolü

Doksorubisin, ilk olarak 1970'lerde Streptomyces peucetius bakterilerinden ekstrakte edilen ve meme, akciğer, mide, yumurtalık, tiroid, Hodgkin olmayan ve Hodgkin lenfoma, multiple miyelom, sarkom ve pediatrik kanserler dahil olmak üzere birçok kanserin tedavisinde rutin olarak kullanılan antrasiklin türevi bir ilaçtır (Weiss, 1992).

Doksorubisinin kanser hücresinde etki ettiği öne sürölen temel iki mekanizma vardır;

(i) DNA'ya interkalasyonu ve topoizomeraz-II aracılı DNA onarımını bozması.

(ii) serbest radikallerin oluşumu ve bunların hücresel zarlara, DNA ve proteinlere zarar vermesi.

Kısaca, doksorubisin, reaktif oksijen türlerini serbest bırakan bir süreçte tekrar doksorubisine dönüştürölen kararsız bir metabolit olan semikinona oksitlenir. Reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonu ve membran hasarı, DNA hasarı ile oksidatif strese yol açabilir ve hücre ölümünün apoptotik yollarını tetikler (Thorn vd., 2011).

Antrasiklin dışındakiler; Miyomisin, aktinomisin D ve bleomisin.

DNA'ya bağlanarak DNA'da kırılmalara neden olur.

c. Antimikrotüböler ajanlar

Topoizomeraz II inhibitörleri: Antrasiklinler doksorubisin, daunorubisin, idarubisin, mitoksantron,

RNA ve DNA sentezini inhibe eder. Ek olarak, topoizomeraz II'yi inhibe ederek DNA onarımının inhibisyonuna neden olarak DNA ve RNA sentezinin blokajına neden olur.

Topoizomeraz I inhibitörleri: İrinotekan, Topotekan.

hücre içeresinde çift sarmallı DNA'nın replikasyonu sırasında bu çift sarmalın açılması Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II enzimleri ile gerçekleşir. Topoizomeraz enzimlerini inhibe eden ajanlar bu enzimlerin parçalanabilir kompleksden salınımını engelleyerek DNA'nın replikasyonunu önler (Fırat ve Yıldız, 2020).

Taksanlar – porsuk ağacı kabuklarından elde edilen paklitaksel, dosetaksel, kabazitaksel gibi bitkisel kökenli alkaloidlerdir.

Mitoz bölünmedeki iğ iplikciklerin oluşumundaki mikrotübüllerin polimerizasyon ve depolimerizasyon dengesini etkileyerek, anormal hücre fonksiyona ve apoptoza neden olan replikasyonun bozulmasına sebep olur. M fazına etkili ajandır.

Vinka alkaloidleri: vinblastin, vinkristin, vinorelbin.

Tubuline bağlanırlar ve mikrotübül oluşumuna engel olarak, hücreyi metafaz aşamasında bekletir. M fazına özgüdür (Bodley vd., 1989).

d. Antimetabolitler

Bu grupta yeralan kemoterapötik ilaçların nükleik asit oluşumunda rol alan metabolitlerin antagonistidir ve bu yolla DNA replikasyonunu inhibe eder. Etkilerini S fazında gösterdikleri için Faz spesifik ajanlar olarak ta adlandırılırlar.

Sitidin analogları; azasitidin, sitarabin, desitabin, gemitabin.

Hasar görmüş DNA'nın onarımını engellerler. Bu metabolitler DNA'nın sentezini bozarak ribonükleotid reduktaz, DNA metiltransferaz ve DNA polimerazı inhibe ederler.

Folat antagonistleri; pemetreksed ve metotreksat.

Dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümü için gerekli olan folik asidi azaltır (Hagner ve Joerger, 2010).

Pürin antimetabolitleri; 6-Merkaptopurin ve Fludarabin.

Guanin yapısal analoglarıdır ve guanine bağlanarak ve DNA sarmalında yanlış okunmalara sebep olurlar.

Pirimidin analogları – fluorourasil (5-FU), kapesitabin.

Yalancı nükleotid olarak direkt RNA'ya dahil olur. Aktifleşmesi için oksidatif fosforillenmesi gerekmektedir. Aktif metabolit (F-dUMP), indirgenen folik asitin varlığında timidilat sentetaz ile sıkı bir kompleks oluşturur ve DNA'nın yapısını bozar (Kayaalp, 2000).

e.Diğer

- i. Hidroksiüre
- ii. Tretinoin
- iii. Arsenik trioksit
- iv. Proteazom inhibitörleri (Gurnari vd., 2021).

1.3.1.4. Endokrin (hormon) tedavisi

Cerrahi tedavi sonrası kanserin tekrar nüks etme olasılığını azaltmak için uygulanan sistemik tedavi seçeneğidir. Steroid yapıdaki östrojen hormonu menapoz dönemine kadar overlerden, menapoz döneminde ise eser miktarda yağ doku tarafından salgılanır. Östrojen, meme kanserinin oluşmasında kilit rol oynar ve bundan dolayı kadınlarda erkeklere oranla 100 kat daha yüksek oranda meme kanseri vakası görülür (Santen ve Allred, 2007).

Çoğu meme kanserinde östrojen reseptörü varlığı belirlenmiş ve meme karsinomunun büyümesini ilerlettiği kanıtlanmıştır (Duffy, 2006). Hormon reseptörleri negatif meme kanseri alt tiplerinde hormon tedavisi başarı sağlamadığı için kullanılmamaktadır.

1.3.2. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİD'ler) ve Kanserdeki Roller

Steroid yapıda olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİD'ler) analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkili (ağrı, ateş ve yangıyı azaltan) ilaç grubudur. Aynı etkileri gösteren steroid yapıdaki ilaçlardan ayırd edilmesi için, non-steroidal tanımı kullanılmaktadır. NSAİD'ler olarak bilinen ilaçların kimyasal formları değişken olmasına rağmen hepsinin ortak özellikleri siklooksijenaz (COX) enzimi ve prostaglandin sentezini inhibe etmeleridir (Smith vd., 2000).

Kronik yangı ve kanser arasındaki ilişki uzun zamandır keşfedilmiş olmakla birlikte, NSAİD'lerin kanser tedavisi ve önlenmesindeki kullanımına ilişkin gerçekleştirilen araştırmaların sayısı son on yıldır giderek artmaktadır (Wong, 2019), NSAİD'lerin kanser tedavisindeki olumlu etkileri, özellikle malign tümörlerin COX reseptörü pozitif olduğu olgularda, prostaglandin sentezi ve yangıyla ilişkili sitokinlerin sentezinin önlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Kanserli dokulardaki yangının azaltılmasına yönelik hedefler arasında COX, NF-kB, sitokinler/kemokinler ve bunların reseptörleri, Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü yer alır (Rayburn vd., 2009). COX'un pankreas (Molina vd., 1999), prostat (Kamijo vd., 2001), servikal (Kulkarni vd., 2001), meme, akciğer ve kolon (Soslow vd., 2000) kanserinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. COX'un aşırı ifadesinin, invazyon ve metastazda önemli bir rolü olan anjiyogenezi (Leahy vd., 2002) uyardığı bilinmektedir. Tümör hücrelerinde COX'un aşırı ifadesi aynı zamanda kanser hücrelerinin Bcl-2 gibi anti-apoptotik belirteçlerin ifadesinde artışa neden olduğu da gösterilmiştir (Tsuji ve DuBois, 1995).

NSAİD'ler iyi bilinen COX inhibitörleri olduğundan, kanser tedavisi ve önlenmesinde kaçınılmaz olarak popüler bir antikanser antiinflamatuvar adaydırlar. COX aktivitesinin bazı ürünleri (prostaglandin E2 gibi) tümörigenezde yer aldığından, COX'un inhibe edilmesi iyi bir strateji olarak görülebilir. Prostaglandin E2 düzeylerinin (PGE2) COX reseptörü pozitif kanser hücrelerinde arttığı (Roberts, 2011) ve kanser hücre proliferasyonu ve invazyonunu uyarabildiği görülmüştür (Ke 2016). COX-2/PGE2 sinyal yolağının kolorektal tümörigenezde çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Araştırmalar, COX-2 ve PGE2 ifadesindeki artışın, özellikle glikozdan yoksun tümör mikroçevresinde kolorektal kanser hücresi sağkalımını desteklediğini göstermektedir (Roberts vd., 2011).

1.3.2.1. COX-2/PGE-2 Yolağının Kanserdeki Rolü

NSAİD'lerin antitümoral özelliklerinin daha iyi belirlenebilmesi için özellikle COX-2'nin proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptozdaki fonksiyonlarının netleştirilmesi önemlidir. Antikanser etkilerinin çoğu COX-2/PGE-2 düzenlenmesiyle gerçekleştiği için, bu döngüde rol alanlara yapılabilecek doğrudan müdahale, NSAİD'lerin olumsuz yan etkileri önlemek için umut vadeden bir yaklaşım olabilir.

Yangı, artan hücre proliferasyonu ve azalmış DNA onarımı ile karakterize olduğundan kansere zemin hazırlayabileceği ve aralarında pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Torgovnick ve Schumacher, 2015). Yangı bölgesinde toplanan nötrofil ve monositler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve PG'lerin yanı sıra bölgede proenflamatuar sitokin kaynaklarıdır. PGE2 bir damar genişleticidir ve hücrelerin anjiyogenezini ve çoğalmasını sağlar. Ayrıca bağışıklık sistemini baskılayarak ve apoptozu inhibe ederek tümör oluşumunu destekler (Desai vd., 2018). Siklooksijenaz, membran fosfolipidleri tarafından salınan araşidonik asidin prostaglandin H2'ye (PGH2) biyotransformasyonunu başlatan anahtar enzimdir. PGH2, reaksiyonun gerçekleştiği dokuya özgü enzimler (PGDS, PGES, PGFS, PGIS ve TXA) tarafından çeşitli prostaglandinlere (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2) ve tromboksan A2'ye (TxA2) dönüştürülür. ancak tercihen COX-2'nin doğrudan PGE2 ve PGI2'yi sentezlediği gösterilmiştir. Tüm bu prostaglandinler dağıldıktan sonra, öncelikle spesifik G-protein eşli reseptörler (GPCR) ailesine ait olan ve her biri farklı sinyal sistemleri başlatan dört farklı EP1-4 membran reseptörleri ile işlev görürler (Coleman vd., 1994; Liu vd., 2015; Yao ve Narumiya, 2019).

EP1'in kanser gelişiminde ikincil bir alt rolü varmış gibi görünse de, EP2-EP4 reseptörleri tümör sinyalizasyonunda ana reseptörlerdendir. Tümör oluşumunda EP1, tümör hücresi göçü ve hipoksi ortamına adaptasyonuna aracılık eder. EP1 reseptörü fosfolipaz C (PLC) yolağıyla protein kinaz C'yi (PKC) aktive eder. Bu aktivasyon sonucu nükleer faktör-kappa B (NF κ B) ve Bcl2 / Bad pro-apoptotik yollarıyla gen transkripsiyonu etkilenir (O'callaghan ve Houston, 2015). Ayrıca EP1'in UVB ile indüklenmiş yassı epitel hücreli deri kanserlerinde, sağlıklı deridekine oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Lee vd., 2005). EP2 ile aktive olan G α sAMP-ERK sinyal yolağı veya EP4 tarafından aktive olan Ras/MAPK/ERK sinyali gibi ikincil mesajlaşma sistemleri hücrel farklılaşma, hücrenin hayatta kalması, hücre büyümesi ve apoptoz gibi temel hücrel fonksiyonları etkileyebilmektedir. Ayrıca EP2'nin PI3K/Akt sistemiyle hücre sitoplazmasında fosforlanmamış α -katenin formunun birikimine sebep olur ve bunun sonucu olarak da hücre büyümesi ve anjiyogenezi sağlamak için bir dizi olay serisi başlatılır.

EP4, adenilat siklazın aktivasyonu, cAMP oluşumu, MAPK sinyalinin aktivasyonu ve CREB aktivasyonunun sonlanmasına neden olmaktadır. Bu da Bcl-2 seviyesinin artması ve p53 aracılı apoptozun inhibisyonuna neden olur (Rundhaug vd., 2011). Ayrıca, tümör

hücre göçü ve metastaza aracılık ettiği de bildirilmiştir (Fujino vd., 2003). EP3'ün karsinogenezdeki rolü hala belirsizdir. Çok sayıda EP3 izoformu, sinyal iletim yollarında farklılık gösterir (Kotani vd., 1997).

Çalışmalar, COX-2/PGE2 yolağının tümör gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu ve enflamatuvar mikroçevre oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Akut yangı, bağışıklık hücrelerini hasarlı dokuya çeken bir dizi sitokin sinyali başlatır. Proinflamatuvar sinyaller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA değişikliklerine neden olan mutajenik ajanlar, hasarlı bölgeye gelen makrofajlardan ve diğer lökositlerden salgılanır (Guo vd., 2017; Kawanishi vd., 2017). Bu proinflamatuvar sinyaller, sitokinler TNF- α , IL-6 ve IL-1, UV radyasyon, karsinojenler, tümör promotörü (TPA), lipid aracıları ve diğer faktörleri içerir. Bu sinyaller, mitojenle etkinleştirilen protein kinaz kinaz (MEKK), mitojenle etkinleştirilen protein kinaz kinaz (MAPKK), mitojenle etkinleştirilen protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör- κ B'nin aktivatör aktivasyonu yoluyla COX-2 sentezini uyarır. NF- κ B, bazı sitokinler (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, G-CSF), bazı adezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) ve enflamasyon enzimleri (Nitrik oksit sentaz, Fosfolipaz A2, COX ve lipoksijenaz), reseptörler (IL-2Ra zinciri, TCR β zinciri) ve inhibitörü I- κ Ba genlerinin düzenlenmesini sağlar. Ayrıca, NF- κ B sinyali kondroitin sülfat tarafından bloke edildiğinde, COX-2 ifadesini önemli ölçüde azalır, bu da aralarındaki pozitif korelasyonu doğrular niteliktedir (Rossi vd., 2000).

1.3.2.2. Selekoksibin Farmakolojik Özellikleri

Selekoksib 1999 yılında ilk kez Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde piyasaya sürülmüştür (Fische ve Ganellin, 2006). Selekoksib, kimyasal olarak 4-(5-(4-metilfenil)-3-(triflorometil)-1H-pirazol-1-il) benzensülfonamid olarak adlandırılır ve diaril ikameli bir pirazoldür. Moleküler ağırlığı 381,373 g/mol'dür. Selekoksibin etki mekanizması, ağrı ve yangı yolağının ayrılmaz bir parçası olan prostaglandin sentezinden sorumlu olan siklooksijenaz-2'nin (COX-2) seçici inhibisyonuna bağlıdır (McAdam,1999). Bu farmakolojik aktivite, selekoksibe analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkilerini kazandırır. Selekoksib, COX-1'i zayıf bir şekilde inhibe eder ve bu nedenle trombosit fonksiyonunu aspirinden daha az etkileyebilir. Selektif COX-2 inhibitörleri, trombosit tromboksanını etkilemeden sistemik ve dolayısıyla muhtemelen endotelial prostasiklin

oluşumunu azaltır. Yüksek dozda selekoksib uygulanmasından sonra TXB2 oluşumunda doza bağlı bir etki gözlenmiştir. Yetişkinlerde akut ağrının giderilmesinde, Osteoartritis, romatoid artritisin semptomlarının tedavisinde, ankilozan spondilit, primer dismenore ve juvenil romatoid artritte ağrı ve iltihabı gidermek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca COX-2, ovülasyonda, duktus arteriozusun implantasyonu ve kapanmasında, böbrek fonksiyonu ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının regülasyonunda da rol oynamaktadır. FDA, kolorektal polip sayısının azaltılmasında için ailesel adenomatöz polipozisi olan hastalarda yardımcı tedavi olarak selekoksib kullanılmasını da önermektedir.

Selekoksib, aşağıda tartışılan antikanser özelliklere sahiptir ve bu özelliklerini, muhtemelen kanserli hücrelerin invazyon yeteneği kazanmasında önemli bir rol oynayan kaderin-11'i (CDH11) bağlayarak gösterir (Assefnia, 2014). Selekoksib; sitokrom p450, 2C9 (CYP2C9) yoluyla kapsamlı bir şekilde metabolize edilir ve CYP2C9 substratları olan diğer ilaçlarla etkileşime girebilir (Wang, 2009).

1.3.2.3. Selekoksinin Antikanser Etkinlikteki Rolü

Son araştırmalar, kemoterapi tedavilerinin antiinflamatuvar ilaçlarla birlikte kullanılmasının hasta prognozunu iyileştirmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir (Shi vd., 2018). Prostat, meme, akciğer ve kolorektal kanserli 300.000 hasta ve 16 farklı merkezde gerçekleştirilen bir meta-analiz araştırma sonuçlarına göre, NSAİD'lerin uzak metastazı azaltma potansiyeli bulunduğu gösterilmiştir. NSAİD'lerin kanser profilaksi ve metafilaksisi üzerine adjuvan olarak potansiyel etkileri bulunmakla birlikte, uzun süreli ve yüksek doz kullanımları yan etkileri nedeniyle sınırlı kalmıştır (Zappavigna vd., 2020).

COX-2 inhibitörleri ve epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörlerinin (EGFR-TKI) kombinasyon terapileri, COX-2'nin karsinogenezdeki önemi göz önüne alındığında, kanser tedavisindeki keşifler için ilgi çekici bir yaklaşım gibi görünmektedir (Li vd. 2020). Tümör hücrelerinde gelişmiş EGFR aktivitesi, COX-2 aşırı ifadesi ile yakından ilişkilidir. Artan COX-2 dönüşümü ve prostaglandin E2 üretimi, aktive edilmiş EGFR sinyalinden kaynaklanabileceği ve bunun da COX-2 aktivitesinin artmasına neden olabileceği değerlendirilmektedir (Kao vd., 2009, Han vd., 2015). EGFR ve COX-2 sinyal yolları arasındaki pozitif geri besleme döngüsü göz önüne alındığında, seçici COX-2

inhibitörlerinin farklı etki mekanizmasına sahip kemoterapi/immünoterapi ile kombinasyonu ile çoklu antitümöral etkinlik elde edilmesi mümkün görünmektedir (Li vd., 2020). Seçici COX-2 inhibitörlerinin COX-2/PGE2 ve TLR/MyD88 yollarını inhibe ederek enflamatuar mikroçevrenin düzenlenmesi, özellikle kolorektal kanser gelişimini ve invazyonunun önlenmesinde etkili bir strateji olabileceği gösterilmiştir (Ji vd., 2021).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmanın in vitro deneyleri Amerika Birleşik Devletleri Purdue Üniversitesi, Kapsamlı Patobiyoloji Bölümündeki Dr. Sulma Mohammed'in Laboratuvarında yapılmıştır.

2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat

- Karbondioksit İnkübatörleri
- ELISA okuyucu (Spectra iX3)
- İnverted Mikroskop (Olympus-CKX41)
- Işık Mikroskobu (Olympus BX51)
- Hücre Sayım Cihazı (İnvitrogen countess 3)
- Santrifüj
- Karıştırıcı (Vorteks)
- Derin Dondurucu (-20 °C)
- Derin Dondurucu (-80°C)
- Buz Makinesi
- Çalkalama Cihazı
- Biocare Decloaking Chamber Cihazı
- Otomatik Mikro Pipetler
- Pipet Tabancası
- Hassas Terazî
- Sıvı Azot Tankı
- Laminar Flow Kabin
- Western Görüntüleme Makinası

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

- DMEM ve RPMI
- Fetal bovine serum

- Penicillin-streptomycin
- Trypsin-EDTA
- Hücre kültürü plakaları
- 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları
- Dulbecco fosfat tamponlu salin (DPBS)
- Hidrojen Peroksit solüsyonu
- DMSO
- 15-50 ml'lik Falkon Tüp
- Cryo Tüp
- Pipet Ucu
- Kalın Blot Paper-Filtre Kâğıdı
- Protein Ladder
- Fosfat Tamponlu Salin
- Proteaz İnhibitör
- 10x Sitrat Buffer
- Aquagard –1 Solution
- Trypan Blue
- Harris Hemotoksilen
- Etanol
- Entellan
- %30 Akrilamid mix
- Tris
- SDS
- APS
- TEMED

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Pierce BCA Protein Assay Kiti (Thermo Scientific, Katalog no:23125)

Super Signal West Pico Plus Chemiluminescent Substrat Kiti (Thermo Scientific, Katalog no:34580)

Pre-Diluted Protein Assay Standards Kiti (Thermo Scientific, Katalog no:23208)

İmmunperoksidaz Kiti (Thermo Scientific, Katalog no: TP-060-HLX)

DAB Kromojen Kiti (DAB Plus SubstrateSystem, Thermo Fisher Scientific, Katalog no: TA-060-HDX,)

RealTime-Glo MT Hücre Canlılık Test Kiti (Promega, Katalog no: G9711)

MTT Hücre Canlılık Test Kiti (ThermoFisher, Katalog no: M6494)

2.2. Hücre Hatları

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları.

Hücre Hattı	Marka/ Model
CMT-U27	CMT-U27-CRL-3456-ATCC
CMT-U309	CMT-U309-CVCL_J401-Cellosaurus
P114	P114-CVCL_L410-Cellosaurus
MDA-MB-231	MDA-MB-231-HTB-26-ATCC

2.3. Kullanılan Yöntemler

2.3.1. İmmunperoksidaz Test Protokolü

Çalışma materyalini oluşturan tümöral ve normal meme dokularına ait lamalar, Purdue Üniversitesi Karşılaştırmalı Patobiyoloji Bölümü Dr. Mohammed'in laboratuvarından sağlanmıştır. Köpeklerde gelişen tümörlerde COX-2 ifadesinin yaygınlığının araştırılması amacıyla; daha önceden 4-5 mikron kalınlığında kesitleri alınmış arşivlenmiş lamlardan 5 adet normal köpek meme dokusu ve 5 adet köpek meme tümörü seçildi. Daha önce köpek dokusunda reaksiyon verdiği kanıtlanmış COX-2 primer antikor (ThermoFisher Monoklonal antikor, Kat no: MA5-42851), kullanıldı. COX-2 aktivitesi streptavidin peroksidaz tekniği kullanılarak immunohistokimyasal olarak işaretlendi.

Daha önce parafin bloklardan 4-5 µm'lik kesitler alınmış adezivli lamalar 1 saat 37 °C derecelik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için kesitler 3 defa 5'er dk süre ile

ksilende bekletildi. Sonra, %100, %96, %90, %80, %70, % 50 lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon yapıldı. Tekrar rehidrasyon işlemi için 5'er dk 2 defa distile sudan geçirildi. Formalin fiksasyonu sırasında oluşan protein çapraz bağlarını kırarak antijenik alanları görünür duruma getirmek amacıyla ısı etkisiyle antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. Bu amaçla lamalar 1x sitrat buffer içerisinde buharlı otoklavda 110 °C'de 30 dk kaynatıldı. Sonrasında aynı solüsyon içerisinde dokular 30 dk soğuması için bekletildi. Soğuyan lamalar PBS te 10 dk yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 30% hidrojen peroksit solüsyonu (Thermo Scientific, kat no: H325-500) metanol ile dilue edilerek (1:9 oranında) solüsyonunda oda ısısında tutulan dokular 15 dk bekletildi. Dokular 10 dk süre ile çalkalayıcı üzerinde PBS ile yıkandı. Protein bloklama solüsyonu (Ultra V Block (TA-060-UB, Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP), Thermo Fisher Scientific) dokuların üzerini kapatacak şekilde eklenerek 15 dk oda ısısında nem çemberinde inkübasyona bırakıldı. Protein bloklama işlemi tamamlandıktan sonra yıkama işlemi yapılmadan lamaların üstüne antikor sulandırma solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırılmış primer antikor ile muamele edildi. 2 saatlik İnkübasyondan sonra primer antikor uzaklaştırılarak lamalar 10 dk süre ile çalkalayıcı üzerinde PBS ile yıkandı. Biotinli sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (TP-060-BN), Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP), Thermo Fisher Scientific) dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulanarak 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamalar 10 dk süre ile PBS ile yıkandı. Lamalar üzerine streptavidin-peroksidaz (Streptavidin Peroxidase (TS-060-HR), Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP, Thermo Fisher Scientific) eklenerek 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamalar 5-10 dk süre ile çalkalayıcı üzerinde PBS ile yıkandı. Lamalar üzerine kromojen olarak 3,3-diaminobenzidin (DAB Plus SubstrateSystem TA-060-HDX, Thermo Fisher Scientific) 2 ml substrat içerisinde 1 damla (50 µl) kromojen olmak üzere 1-5 dk uygulandı ve ardından lamalar distile su içerisinde 5 dk tutuldu. Harris hematoksilende (Merck Millipore) 2 dk arka plan boyaması yapıldıktan sonra lamalar akan suda 10 dk yıkandı. Lamalar 10'ar saniye süre ile 95 ve 100 derecelik alkolde ve 10-20 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan (Merck Millipore) kullanılarak lamel ile kapatıldı. DP25 kamera eklentili Olympus BX51 mikroskop ile değerlendirilerek mikroskopik fotoğrafları çekildi.

2.3.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması

Kriyotüpler içinde %80 RPMI 1640, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren kriyotüpler içinde dondurulmuş olan CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları -80 °C'den çıkartılıp, 10 ml RPMI bulunan falkon tüpe aktarıldı. Hücreler, 24°C'de 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Peletin bulunduğu falkona 5 ml RPMI eklenerek, pipetasyon yapıldı ve tüm hücreler %10 Fötal Buzağı Serumu(FBS) ve 10000 µg/µl penisilin-streptomisin içeren, uygun kültür ortamında, 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Her üç gün sonunda besiyeri değiştirilip hücreler plakanın%90'ını kaplayacak kadar çoğaldığında, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1 kez 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında flaska tripsin eklenerek, %5 CO₂ içeren etüvde 37 °C'de, 3-5 dk. inkübe edildi. Hücrelerin mikroskop altında yüzmeye başladığı görüldüğünden tripsinin toksik etkisinin durdurulması amacıyla tripsinin iki katı kadar besiyeri eklendi ve falkon tüpe aktarıldı. Hücreler 24°C'de 800rpm'de, 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak çöktürülen hücre tabakalarının üzerine yeni besiyeri eklenerek pipetasyon yapıldı. Sonrasında ise hücreler istenen konsantrasyonda uygun kültür tabakalarına ekildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.

2.3.3. Hemositometrik Hücre Sayımı

Canlı hücre sayımı, invitrogen countess 3 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsin ile muamele edilip kaldırıldıktan sonra santrifüj edilerek pellet elde edildi. Elde edilen bu pelletin üzerine 1 ml hücre besiyeri eklenerek süspanse edildi. Bu süspansiyondan 10µl örnek alındı ve 10µl tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Toma lamı ve lameli arasındaki boşluğa, hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl eklendi. Hücre sayım cihazına konularak canlı hücreler hesaplandı.

2.3.4. Selekoksib, Doksorubisin ve Siklofosamid İlaçlarının Hazırlanması

381,373 g/mol moleküler ağırlığa sahip olan selekoksib dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürüldü. Çözündükten sonra RPMI eklenerek 10.000 µM'lık stok hazırlandı ve deneylerde kullanılmak üzere seyreltilerek stoklandı. Nihai DMSO konsantrasyonu en

yüksek ilaç konsantrasyonu için %0,1'i olacak şekilde ayarlandı ve her bir test prosedüründe %0.1 DMSO kontrol grubu kullanıldı.

Doksorubisin (543,52 g/mol) ve siklofosamid (261,086 g/mol) RPMI içerisinde çözdürüldü. Tüm stok ve seyreltilmiş çözeltiler kullanılıncaya kadar -80°C de saklandı.

2.3.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücre hatlarının in vitro kültür ortamında devamlı üretilmesi mümkün olmadığından ve pasajlama sayısı ilerledikçe hücrelerin morfolojik ve biyolojik özelliklerinde değişiklikler meydana gelmesinin önüne geçilebilmesi amacıyla hücre serileri donduruldu. Hücrelerin dondurma ve çözme aşamalarında oluşabilecek zararları en aza indirmek amacıyla DMSO solüsyonu kullanıldı (Lovelock ve Bishop, 1959). Hücreler yeterli konfluense ulaştığı zaman plakadaki besi yeri uzaklaştırıldı ve 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında hücreler 1x Tripsin-EDTA solüsyonuyla plaka tabanından kaldırıldı. Hücrelere 10 ml içerisine besiyeri eklendi ve falkon tüpüne alınarak 2000 rpm +4°C'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet 800 µl besiyeri ve 100 µl buzağı serum ile seyreltilerek kriyovial tüpe alındı. Üzerine 100 µl DMSO eklendi ve -80°C'ye kaldırıldı. Daha uzun süre stoklanmak istenilen hücreler -196 °C'lik sıvı azot tankına aktarılarak ileride kullanılmak üzere saklandı.

2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

2.4.1. RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılık Testi

İn vitro hücre canlılığını sürekli ölçümlerle değerlendirme fırsatı sunan bu test için Promega The RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay test kiti kullanıldı. Bu hücre canlılık testi, hücrelere NanoLuc® lusiferaz ve hücrenin içine girebilen prosubstrat olan MT hücre canlılığı substratının eklenmesini içerir. MT hücre canlılığı substratı, metabolik olarak aktif hücreler tarafından bir NanoLuc® substratına indirgenir ve NanoLuc® substratı, hücrelerden çevredeki kültür ortamına yayılır ve parlak bir sinyal üretmek için NanoLuc® enzim tarafından kullanılır. Sinyal, canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir. Ölü hücreler substratı azaltmaz ve sinyal üretmez. Sürekli okuma formatında, hücre canlılığını gerçek zamanlı olarak analiz etmek için parlak sinyal uzun bir süre

boyunca aynı kuyucuklardan sürekli olarak izlenebilir. Her hücre hattının farklı substrat indirgeme potansiyeli ve MT hücre canlılığı substratını azaltmak için değişen kapasitelere sahip olduğundan her bir hücre serisi için hücre yoğunluğuna göre analiz doğrusallığını karakterize etmek amacıyla ilkin standardizasyon gerçekleştirildi. The RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılık testi için yapılan işlemler:

MT Cell Viability Substrate, NanoLuc® Enzimi ve hücre kültürü ortamı 37°C'ye dengelendi. Herbir hücre farklı hücre yoğunluklarında (200/250/300/400/500) 96 kuyucuklu beyaz bir test plakasına ekildi. MT Cell Viability Substrat ve NanoLuc® Enzim 37°C hücre kültürü ortamına 2X konsantrasyonda eklendi. 1 ml 2X RealTime-Glo™ reaktifini hazırlamak için 2 µl MT Hücre Canlılığı Substratı, 2µl NanoLuc® Enzim ve 996 µl hücre kültürü ortamı ekleyerek vorteks ile iyi bir şekilde karıştırıldı. Her bir kuyucuğa eşit hacimde 2X RealTime-Glo™ reaktifi eklendi. Örneğin, hücreler 40µl besi yeri ile kaplanırsa hücrelere 40µl 2X RealTime-Glo™ reaktifi eklenmiştir. Hücreler 37°C'de ve %5 CO2'de 1 saat inkübe edilir. Plaka okuma luminometresi kullanılarak lüminesansı ölçüldü ve hücreler tekrar inkübasyona bırakıldı. Sürekli okuma formatı için hücre yoğunluklarının doğrusal aralığını belirlemek üzere, istenen zaman aralıklarında (24 saat ve 48 saat) lüminesansı ölçmeye devam edildi. Her grup için ortalama lüminesansı hesaplandı. Selekoksisib, siklofosfamid ve doksorubisin türevi bileşiklerin antikanser etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, köpek meme tümörü (CMT-U309, CMT-U27 ve P114) ve insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) 'nda 24 ve 48nci saatlerde lüminesans değerleri ölçülmüştür.

2.4.2. MTT Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesiyi belirlemek amacıyla yapılan MTT testi, sarı tetrazolyum tuzu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)'nun metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanır. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) piridin nükleotid kofaktörleri sarı renkli MTT tozunu mor renkli suda çözünemeyen formazana indirger ve metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen dihidrojenazlar tarafından tetrazoliumun formazan kristellerine enzimatik dönüşümüyle hücrenin canlılığı ölçülür.

Selekoksib, siklofosamid ve doksorubisin türevi bileşiklerin antikanser etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, köpek meme tümörü (CMT-U27, CMT-U309 ve P114) ve insan meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatlarına MTT testi yapılmıştır.

Tümör Hücrelerindeki antitümoral aktiviteyi belirlemek amacıyla öncelikle CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 hücreleri her kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde, içerisinde 100µl uygun medyum bulunan 96 kuyucuklu kuyucuklara ekildi ve 37°C’de, %5 CO₂’lu inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından, tedavi gruplarına farklı dozlardaki ilaçlar uygulandı (Tablo 6). Selekoksib DMSO içerisinde çözdürüldüğü için kontrol grubundan hariç taşıt madde grubu kullanıldı. Taşıt madde grubunda DMSO’nun toksik etkisi olup olmadığını görmek için, hücreler %0,1 oranında DMSO içeren besiyeriyle muamele edildi. Kontrol grubu ise sadece besiyeri ile muamele edildi. Ayrıca doksorubisinin oluşturabileceği arkaplan etkisini kaldırmak için hücre ekilmeden sadece besiyeri eklenmiş boş gruplar oluşturuldu. 72 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında kanser hücrelerindeki canlılık oranını görebilmek amacıyla MTT testi uygulandı. MTT testi için well plate’lerin her kuyucuğuna 10 µl MTT solüsyonu eklenildi ve 37° C’de mor formazan kristalleri oluşana kadar 4 saat ışığa maruz kalmayacak şekilde inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası metabolik olarak canlı olan hücrelere giren MTT mor-mavi renkli formazon ürününe dönüştüğü için renk değişimi görüldü. Sonrasında MTT içeren medyum uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl isopropil alkol konularak, plaka okuyucusunda (Spectra i3x) 570 nm de absorbans değerleri ölçüldü. %0,1 DMSO içeren ve içermeyen iki grup arasında hücre canlılık oranında anlamlı bir fark saptanmadı. Bütün deneyler 3 kere birbirinden bağımsız olarak, her biri en az 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. Hücrelerin saptanan % canlı hücre oranları grafikler ile gösterildi. Kemoterapötik ilaçların etkinlik ölçütü olarak hücrelerin %50’sini öldüren inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) değerleri excelde hesaplandı.

$$\text{Canlılık \%} = \frac{100 \times \text{OD570e}}{\text{OD570b}}$$

OD570e: numunenin optik yoğunluğunun değeri

OD570b: kontrol (kör) grubunun optik yoğunluğu

Çizelge 2.2. Tedavi gruplarının adlandırılması

Grup Adı	Kısaltma
Kontrol	-
DMSO kontrol	-
Selekoksisib	CXB
25µM Selekoksisib	25µM CXB
50µM Selekoksisib	50µM CXB
75µM Selekoksisib	75µM CXB
100µM Selekoksisib	100µM CXB
Doksozobisin	Dox
Silkofosfamid	CYP
Doksozobisin+25µM Selekoksisib	DC1
Doksozobisin+50µM Selekoksisib	DC2
Doksozobisin+75µM Selekoksisib	DC3
Doksozobisin+100µM Selekoksisib	DC4
Silkofosfamid+25µM Selekoksisib	CC1
Silkofosfamid+50µM Selekoksisib	CC2
Silkofosfamid+75µM Selekoksisib	CC3
Silkofosfamid+100µM Selekoksisib	CC4

2.5. Western Blot Analizi

Bu yöntem ile araştırmada kullanılan bütün hücre hatlarının COX-2 ifade seviyeleri belirlendi. Western blot analizi için her bir hücre hattı plakası %90'lık hücre yoğunluğuna ulaştığı zaman aşağıdaki prosedürler sırasıyla yapıldı.

Western blot aşamaları;

Hücreler biriktirildi ve lizis aşamasına geçildi. Protein konsantrasyonlarının Proteinlerin Bisinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile hesaplandı ve SDS-PAGE (Elektroforez) de yürütüldü. Jelden Nitrosellüöz membrana aktarılarak bloklama ve antikor aşamasından sonra görüntüleme işleminde yapıldı.

2.5.1. Western Blot Analizi İçin Protein İzolasyonu

Plate'lerden besiyeri uzaklaştırılıp 1x PBS ile yıkandı. Sonrasında her bir plate 2 ml 1x tripsin-EDTA eklenip 4-5 dk inkübatörde bekletildi. Hücrelerin plate tabanından kalkıp

yüzdüğü kontrol edildikten sonra üzerlerine 50 ml 1x PBS eklendi ve falkon tüplere alınıp yıkandı. 30000 rpm +4°C’de 10 dk santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı. Herbir pellet tekrar 5 ml 1x PBS ile yıkandı ve süpernatant atıldı. Tüpün dibinde bulunan pellet buz üzerine alındı. Dipteki hücrelerle lizis aşamasına geçildi. Ripa Buffer solüsyonu aşağıdaki tarife göre hazırlandı ve 10 ml Ripa buffer solüsyonu içine 1 tablet protez inhibitörü (Pierce Protease Inhibitor, Kat. no: A32963) katılarak lizis solüsyonu hazırlandı.

Çizelge 2.3. RIPA Buffer Hazırlanması.

RIPA Buffer Hazırlanması		
Reaktif	Hacim	Nihai Konsantrasyon
Tris-HCl (1M)	5 ml	50 Mm
Nonidet P-40	1 ml	% 1
NaCl (5M)	3 ml	150 Mm
SDS (%10)	1 ml	% 0.1
Sodyum deoksikolat (%10)	5 ml	% 0.5
Distile su	100 ml’ye tamamla	

Hazırlanan bu RIPA lizis buffer solüsyondan eppendorflara pellet büyüklüğüne göre 100-200 µl eklendi. Hücrelerin tam olarak parçalanabilmesi için 10 kez iğneden geçirildi. Sonrasında 14.000 rpm +4°C’de 25 dk santrifüj edildi. Dipteki pellet atıldı ve süpernatant yeni eppendorflara aktarıldı ve -80 e kaldırıldı. Böylece western blot için preoteinler elde edildi.

2.5.2. Proteinlerin Bisinkoninik Asit (BCA) Yöntemiyle Ölçümü

-80 °C’de stoklanmış bütün proteinler buz üzerine alındı ve çözülmesi beklendi. Ölçüm için Pierce Bisinkoninik Asit Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ve 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Her bir kuyucuğa 5’er µl hazırlanan protein standartları ve konsantrasyonu bilinmeyen protein örneklerinden eklendi. Kuyucuklardaki protein örneklerinin üzerine 20 µl steril moleküler su eklendi. Sonrasında 175 µl çalışma çözeltisi (kit içeriğinde yer alan Reagent A ve Reagent B, 1:50 olacak şekilde hazırlandı) pipetlendi ve total hacim 200 µl’ye ayarlanarak plate 30 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm’de (Spectra xi3) okundu. 3 dk

çalkalayıcıda bekletildi ve 750 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. 750 nm dalga boyunda absorbans değerleri kullanılarak 50 µg'daki proteinler hesaplandı.

2.5.3. SDS-PAGE ve Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi

SDS-PAGE jeli, resolving jel ve stacking jel olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Jel, resolving ve stacking jel olmak üzere iki katmanlı olarak hazırlandı (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Resolving Jel ve Stacking Jel Formülasyonu

Resolving Jel (%10)		Stacking Jel (%4)	
% 30 Acrylamide/bis	6 ml	% 30 Acrylamide/bis	1.98 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 ml	1.5 M Tris-HCl	3.78 ml
10 % SDS	150 µl	10 % SDS	150 µl
ddH ₂ O	5.03 ml	ddH ₂ O	9 ml
TEMED	7.5 µl	TEMED	15 µl
10 % APS	75 µl	10 % APS	75 µl

Yukarda tarif edildiği şekilde hazırlanan jele en son TEMED eklendi ve yavaşça karıştırılarak jel aparatına döküldü. Jel döküldükten sonra dalgalanmalar oluşabilir. Bu dalgalanmaları ortadan kaldırabilmek için 1 ml etanol alkol pipetle jelin üzerinde gezdirildi. Resolving jelin donması için 30 dk boyunca inkübasyona bırakılır. Sonrasında Resolving jel üzeri kaplayan ethanol peçete ile emdirildi.

Tamamen donmuş Resolving üzerine hızlıca stacking jel pipetle ilave edilerek tarak takılarak ve donması için beklendi. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilip ve jeldeki tarak yavaşça çıkartıldı. İlk kuyuya 3µl marker yüklendi ve diğer kuyulara protein oranı 10 µg olacak şekilde hesaplanarak ve toplam hacim 20µl olacak şekilde pipetle yüklendi. Güç kaynağı 100 volt'a ayarlanarak yaklaşık 1-1,5 saat yürütüldü.

Çizelge 2.5. Running Buffer Formülasyonu

Running Buffer Stok	Running Buffer Çalışma Solüsyonu
30 gr Tris base	100 ml running stok solüsyonu
144 gr glycine	10 ml %10'luk SDS
1 litre (L) dH ₂ O	890 ml dH ₂ O

- Nitrosellüloz membran jel boyutuna uygun olarak kesildi.
- Nitrosellüloz membran ve altı adet filtre kâğıdı transfer buffer içerisine bir süre bekletildi.
- elektroforezde yürütülmesi tamamlanan jel nazikçe çıkarıldı ve kuyuların olduğu kısım kesilerek uzaklaştırıldı. Transfer makinasına ilk önce sırasıyla; 3 adet filtre kağıdı, membran, jel, tekrar 3 adet filtre kağıdı konularak Sandviç modeli oluşturuldu ve roller ile üzerinden geçilerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı ve makine yarım saat süre ile çalıştırıldı.

Çizelge 2.6. Transfer Buffer Formülasyonu

Transfer Buffer Stok	Transfer Buffer Çalışma Solüsyonu
30 gr Tris-base	100 ml stok transfer buffer
144 gr glisin	200 ml metanol
1 L dH ₂ O	700 ml dH ₂ O

Çizelge 2.7. TBS-T Formülasyonu

TBS stok solüsyonu	TBS-T çalışma solüsyonu
31,5 gr Tris-HCL	100 ml TBS stok
80 gr NACI	2 ml Tween-20
1 L dH ₂ O	898 ml dH ₂ O

2.5.4. Bloklama ve Antikor Ekleme

Proteinlerin memebraına aktarılma işleminden sonra memebraın alınarak çalkalayıcıda 30 dk süreyle 7 ml süt tozu (1gr süt tozu+7 ml TBS-T) ile muame edilerek protein bloklama işlemi yapıldı. Daha sonra 1:10.000 dilüsyonda COX-2 antikorı ve β -aktin eklenerek 7 ml süt tozu ile 1 gece +4'de primer antikor içerisinde çalkalayıcıda bekletildi. Ertesi gün membran 5'er dakika süreyle 3 kez TBS-T solüsyonuyla ile çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra uygun sekonder antikor hazırlandı ve (350 mg süt tozu + 7

ml TBS-T + 3,5 µl sekonder) içerisinde 1 saat muamele edildi. Membranlar 5'şer dakika süreyle 3 kez TBS-T solüsyonuyla çalkalayıcıda yıkandı.

2.5.5. Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi

Membran 500 µl ECL solüsyonu A ve 500 µl ECL solüsyonu B karışımı ile muamele edilip, görüntüleme cihazında (BIO-RAD ChemiDoc MP Imaging System) ile görüntülendi.

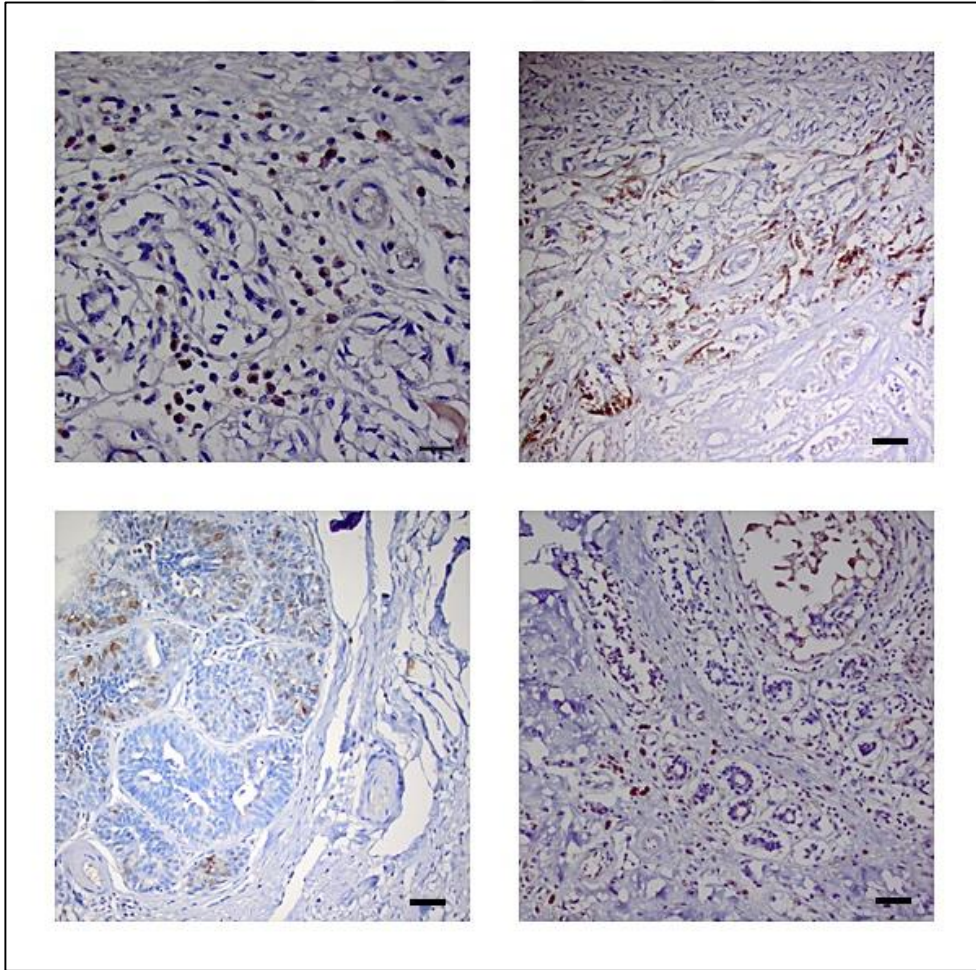
2.7. İstatistik Analizleri

Çalışmada, hücre ve etken grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde varyans analizinden faydalanılmıştır. Grupların 24 ve 48. Saatlerinde tekrarlayan ANOVA testi, 72. Saatte ise ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın anlamlı bulunması durumunda ikili karşılaştırma testlerinden Duncan testi uygulanmıştır. İstatiksel analizler, SPSS 25 paket programında; sonuçların grafikleri ise Graphpad Prism 10 programında yapılmıştır.

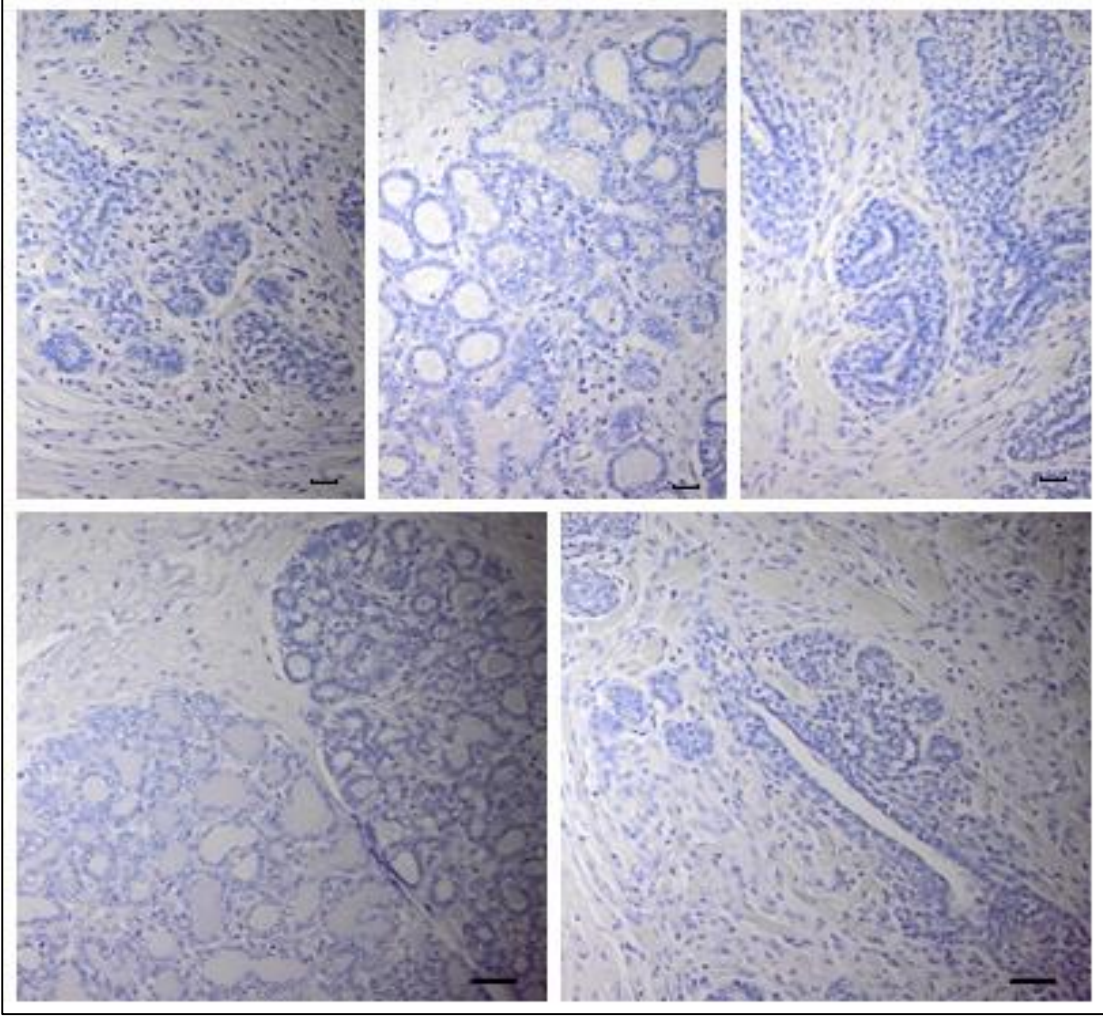
3. BULGULAR

3.1. İmmunoperoksidaz Test ile COX-2 İfasesi Bulguları

Kullanılan meme tümörü hücre serilerinin COX-2 ifade seviyelerinin belirlenmesi için anti-COX-2 primer antikoru ile yapılacak Western Blot analizi öncesinde, kullanılacak antikorun köpek COX-2 antijenik yapılarına spesifik reaksiyon verip vermediğinin değerlendirilmesi amacıyla, daha önceden COX reseptörü pozitif parafin blok arşiv meme tümörü örnekleri (n=4) ve COX negatif olduğu bilinen normal köpek meme dokusu (n=5) immunoperoksidaz test ile değerlendirildi. İncelenen köpek meme tümörü örneklerinde intranükleer ve intrasitoplazmik COX reseptörü pozitif immunreaksiyon görülürken (Şekil 3.1.), normal meme dokularında pozitif boyanma görülmedi (Şekil 3.2.).



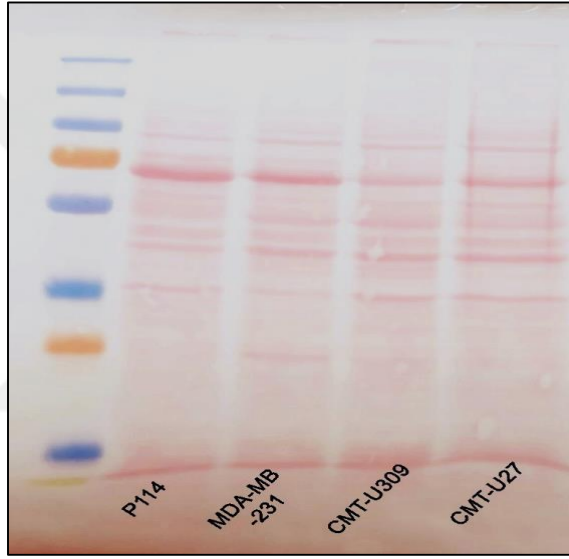
Şekil 3.1. Köpek meme tümörü dokularının COX-2 ifadesinin immunreaksiyonları. Streptavidin-HRP polivan immunperoksidaz boyama, DAB kromojen ve Harris hematoxilen zemin boyama, Bar=100 µm.



Şekil 3.2. Köpek normal meme dokusunda negatif COX-2 ifadesi. Streptavidin-HRP polivan immunperoksidaz boyama, DAB kromojen ve Harris hematoxilen zemin boyama, Bar=100 µm.

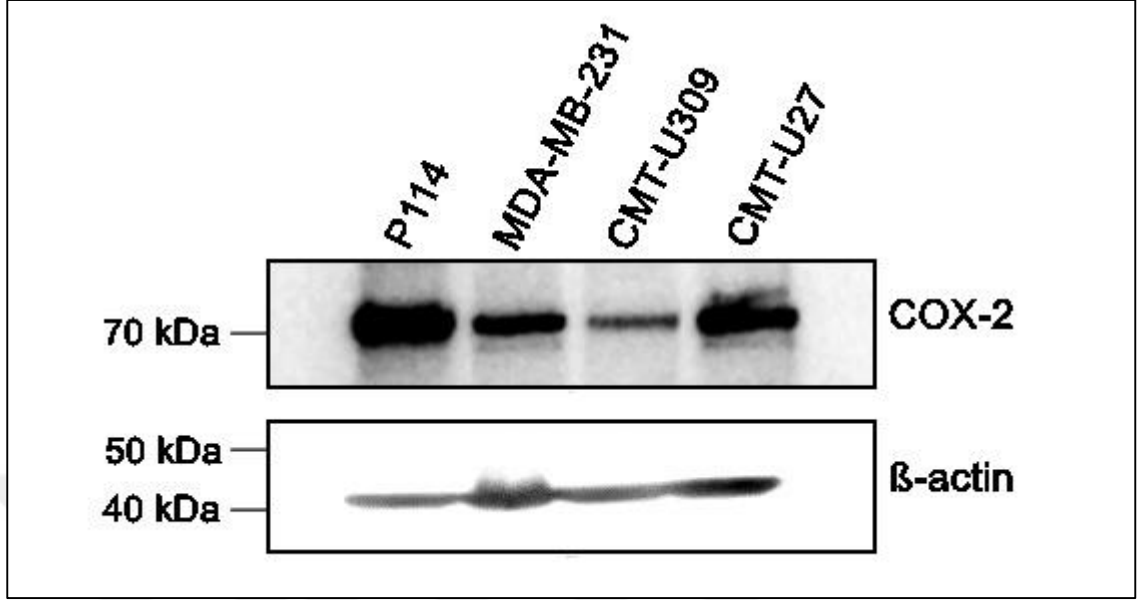
3.2. Western Blot Analizi ile COX-2 Protein İfadelerinin Belirlenmesi

CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından elde edilen protein örneklerinin jelden membrana transferin etkinliğinin başarısını ve ayrıca zar üzerindeki genel protein modelini değerlendirmek için Ponceau S boyaması ile protein bantları görünür hale getirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Ponceau S boyaması ile protein bantlarının tespit edilmesi.

CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından elde edilen protein örneklerinin eksprese ettikleri COX-2 proteini düzeyleri Western Blot analizi ile tespit edildi. Buna göre, COX-2 ifadesi sırasıyla P114, CMT-U27, MDA-MB-231 hücre hatlarında yüksek , CMT-U309 hücre hattında ise düşük görüntülendi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Köpek meme tümörü hücre hatlarında COX-2 ve β -aktin ifadelerinin Western blot tekniği ile görüntülenmesi.

3.3. Hücre Canlılığı Bulguları

3.3.1. Kemoterapötiklerin IC50 Dozunun Belirlenmesi

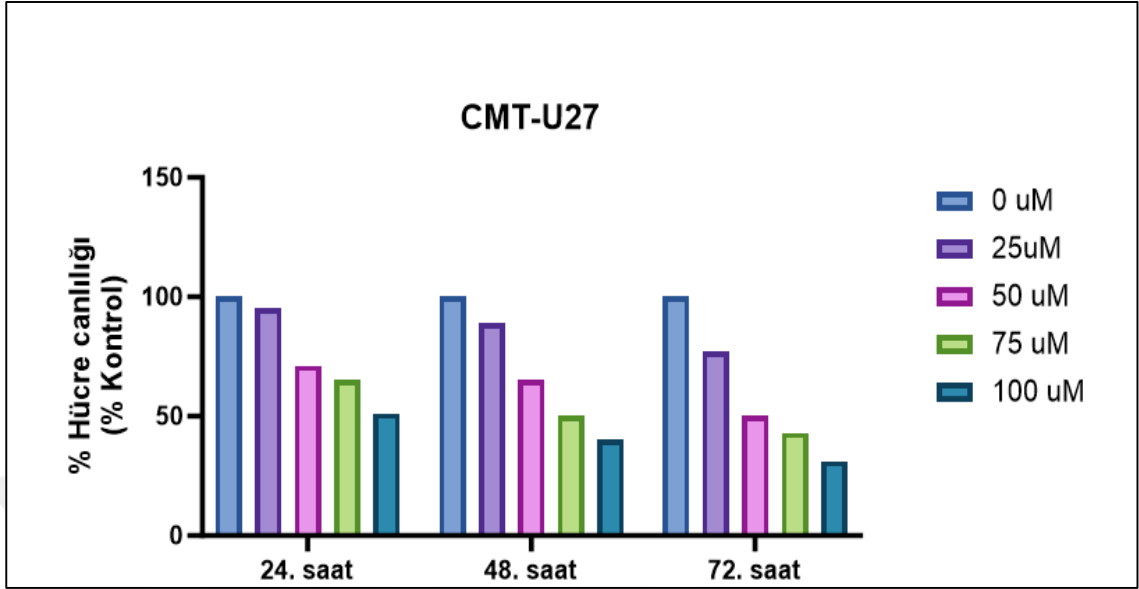
Siklofosfamid ve Doksorubisin'in CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerine en etkin dozunu belirleyebilmek için literatürde rapor edilen hücrelerde %50 inhibitör konsantrasyona (IC50) sebep olan dozlarının farklı derişimleri (2x IC50, IC50, $\frac{1}{2}$ IC50 ve $\frac{1}{4}$ IC50) 72 saat süreyle uygulandı ve ardından hücre canlılığını ölçmek için MTT testi yapılarak IC50 değerleri belirlendi. Meme tümörü hücre hatlarının 72 saat sonunda elde edilen sonuçların yüzde (%) canlılık oranları hesaplandı ve Excel (Microsoft Document) programı kullanılarak IC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Meme tümörü hücre hatlarının IC50 değerleri.

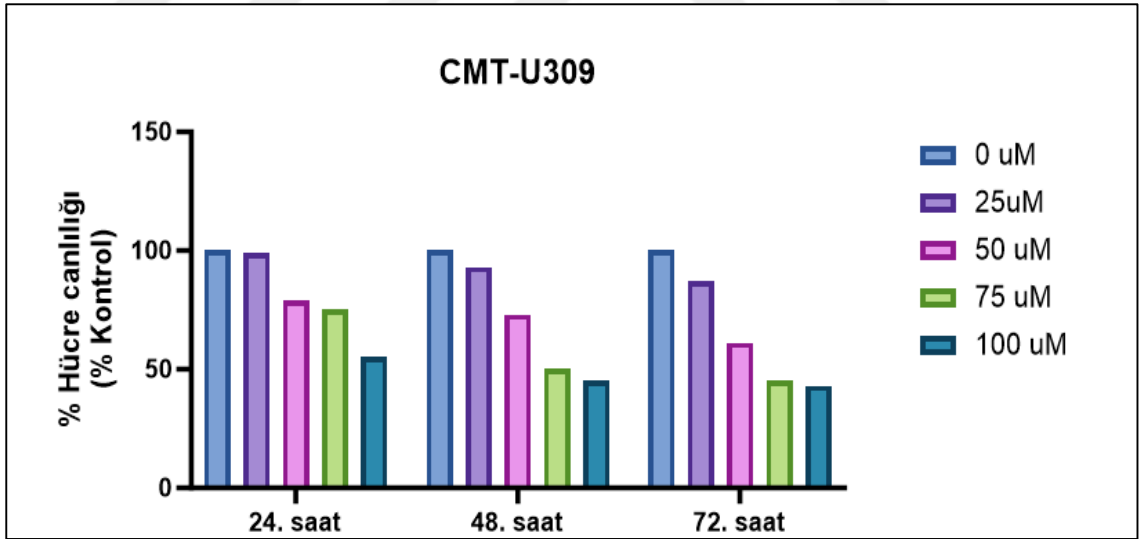
Hücre hattı	Siklofosamid IC50 değeri (mM)	Doksorubisin IC50 değeri(uM)
CMT-U27	7	1.2
CMT-U309	8	0.9
P114	7	0.9
MDA-MB-231	7	2.1

3.3.2. Selekoksinin Düşük ve Yüksek Dozlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

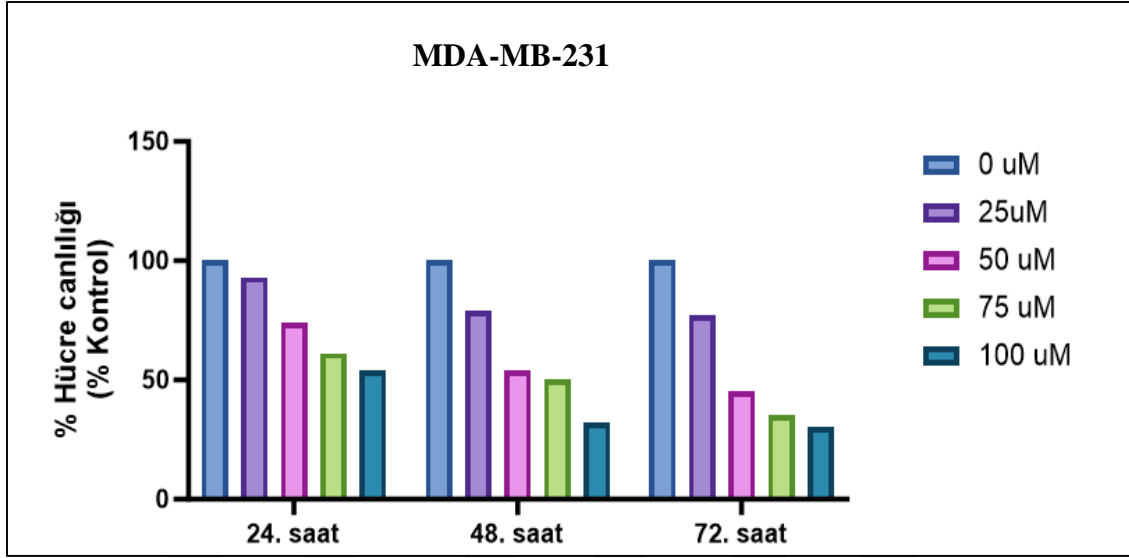
Selekoksinin tek başına kullanımında hücre canlılığı üzerine etkisini test etmek için 25, 50, 75 ve 100 μM dozlarda meme kanseri hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulama yapıldı. Yüksek COX-2 ekspresyonuna sahip hücre hatlarından MDA-MB-231 ve hücre hatlarında 25, 50, 75 ve 100 μM selekoksin uygulamalarının 48 ve 72'nci saat uygulamalarında tümör hücresi proliferasyonu önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 3.7. - 3.8.). Fakat düşük COX-2 ifadesine sahip CMT-U309 hücre hattında düşük doz selekoksin (25 μM) uygulamasında antiproliferatif etki gözlenmemiştir (Şekil 3.6.). Ayrıca, bütün meme kanseri hücre hatlarında selekoksinin 50,75 ve 100 μM 'lık 48 ve 72'nci saat uygulamalarında kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 3.5. – 3.6. – 3.7. – 3.8.).



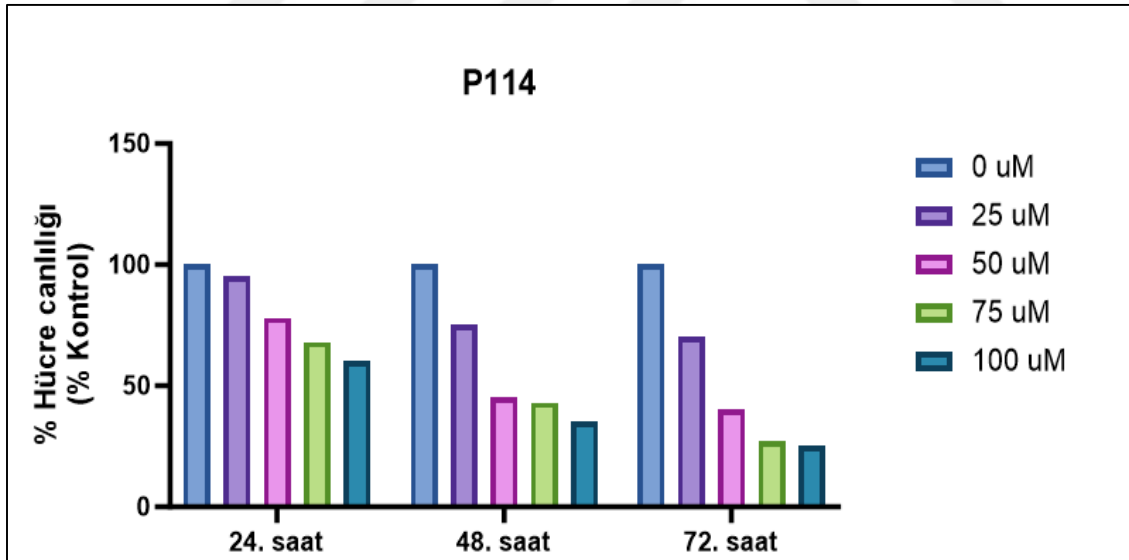
Şekil 3.5. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası CMT-U27 hücre hattı canlılığına etkisi.



Şekil 3.6. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası CMT-U309 hücre hattı canlılığına etkisi.



Şekil 3.7. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi.



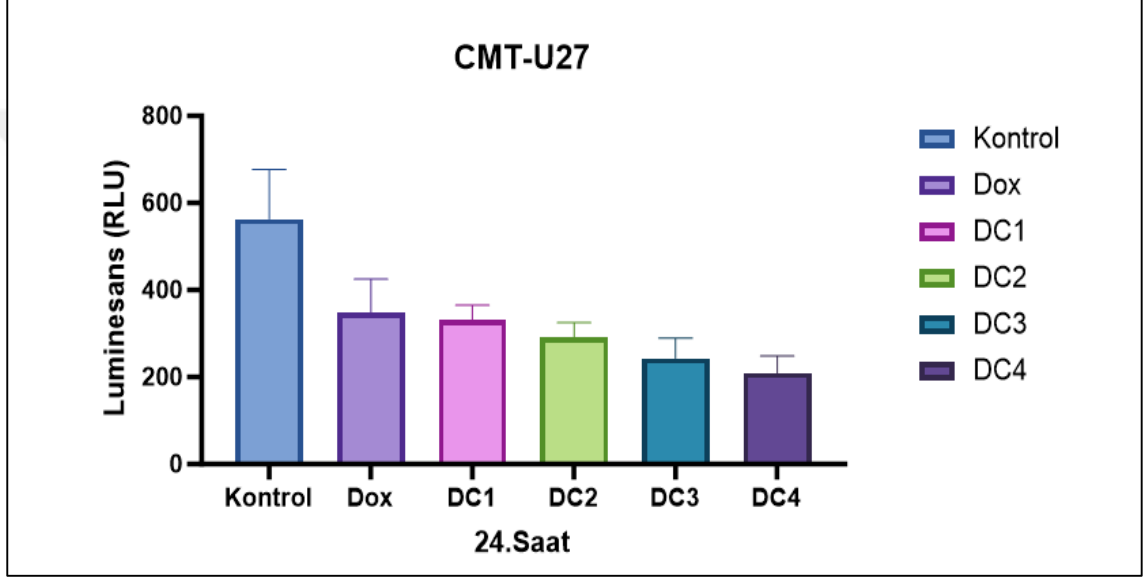
Şekil 3.8. Farklı selekoksib konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72'nci saat inkübasyon sonrası P114 hücre hattı canlılığına etkisi.

3.3.3. Selekoksib ve Kemoterapotik Kombinasyonu 24'üncü Saat Bulguları

Çalışmada, Dox ve CYP'nin IC50 konsantrasyonları sabit tutularak, selekoksibin 4 farklı dozu (DC1: DOX+25µM selekoksib, DC2: DOX+50µM selekoksib, DC3: DOX+75µM selekoksib, DC4: DOX+100µM selekoksib ve CC1: CYP+25µM selekoksib, CC2:

CYP+50 μ M selekoksib, CC3: CYP+75 μ M selekoksib, CC4: CYP+100 μ M selekoksib) ile kombine uygulandıktan sonra COX-2 pozitif meme tümörü hücre hatlarının 24'üncü saat değerleri incelenmiştir.

Dox+Selekoksisib grubunda 24'üncü saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.9 ve Çizelge 3.2'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.9. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standard Sapma).

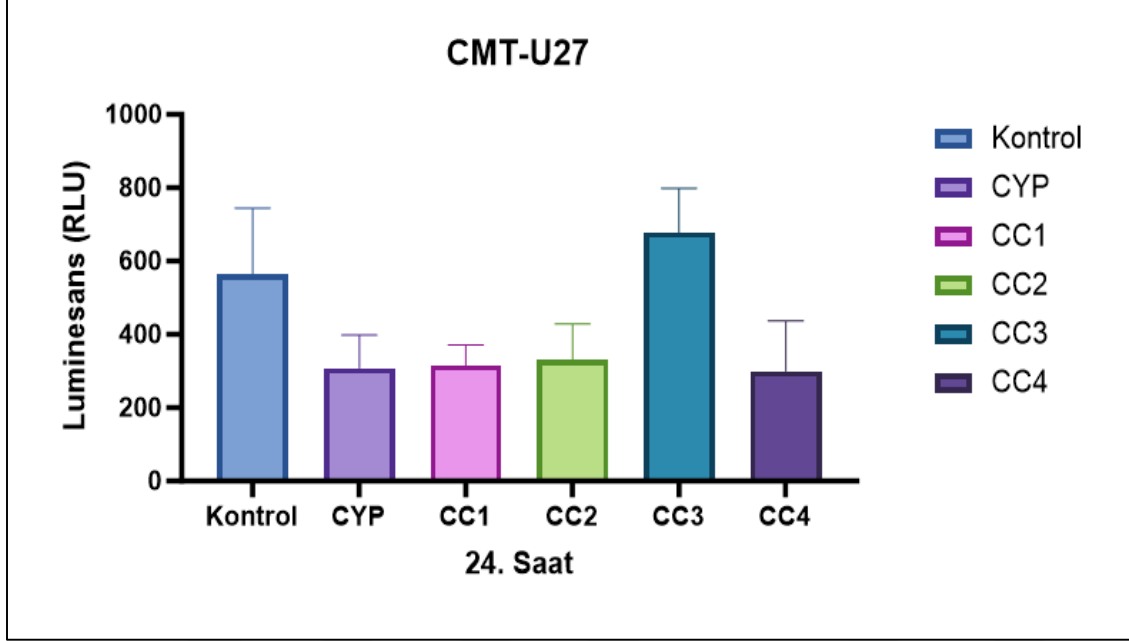
24'üncü saatte, Dox gruplarında CMT-U27 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Etken grupları incelendiğinde, DC3 ve D4 grupları önemli derecede farklılık göstermiştir. En yüksek antiproliferatif etki DC4 grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 24ncü Saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	P
24. saat	563,33±46, 53 ^d	347,66±3 1,52 ^c	329,50±1 4,18 ^c	289,50±1 4,26 ^{b,c}	243,33±1 8,78 ^{a,b}	208,50±1 6,11 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP+ CXB kombine tedavi grubunda 24'ncü saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.10 ve Çizelge 3.4'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.27'da verilmiştir.



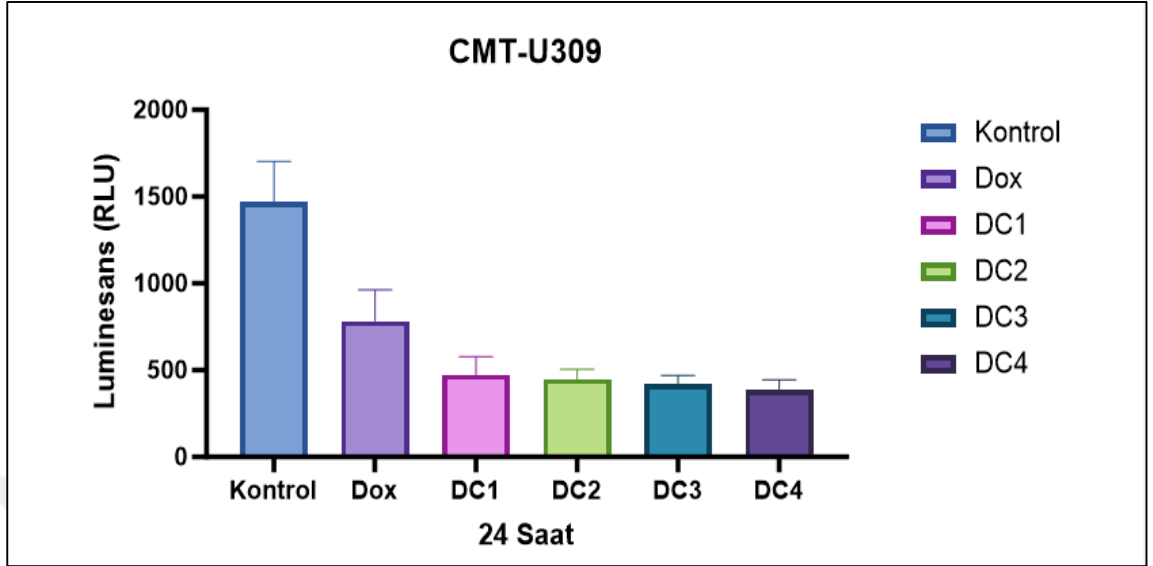
Şekil 3.10. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama± Standard Sapma).

24. saatte, CYP gruplarında CMT-U27 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri ve antiproliferatif etki bakımından etken grupları arasında herhangi bir istatistiksel farklılık tespit edilememiştir (p=0,112).

Çizelge 3.3. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
24. saat	658,33±6	345,16±2	356,16±2	375,00±3	1495,16±	327,66±3	0,112
	3,74	9,26	6,38	7,55	795,96	9,54	

Dox grubunda 24. saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.11. ve Çizelge 3.4'de kontrol grubuna göre % hücre antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.11. CMT-U309 hücre hattı Dox+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standard Sapma).

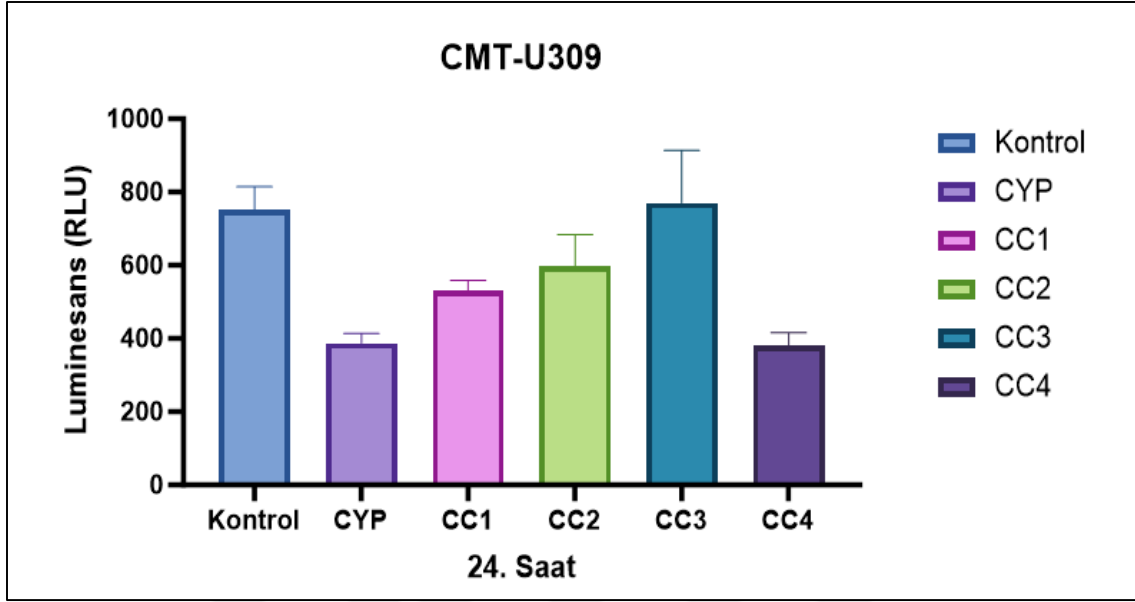
24. saatte, Dox gruplarında CMT-U309 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). En düşük canlılık değeri DC4 grubunda elde edilmiş. Diğer etken grupları arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiş; antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek değer %52,47 ile DC4 grubundan elde edilmiştir.

Çizelge 3.4. CMT-U309 hücre hattı Dox+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	P
24. saat	625,16±7 6 ^c	440,33±3 8,93 ^b	399,66±1 3,7 ^b	361,33±1 2,9 ^b	331,50±2 3,5 ^b	297,16±1 7,7 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP grubunda 24. Saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.12 ve Çizelge 3.5'de; kontrol grubuna göre % hücre antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.12. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standard Sapma).

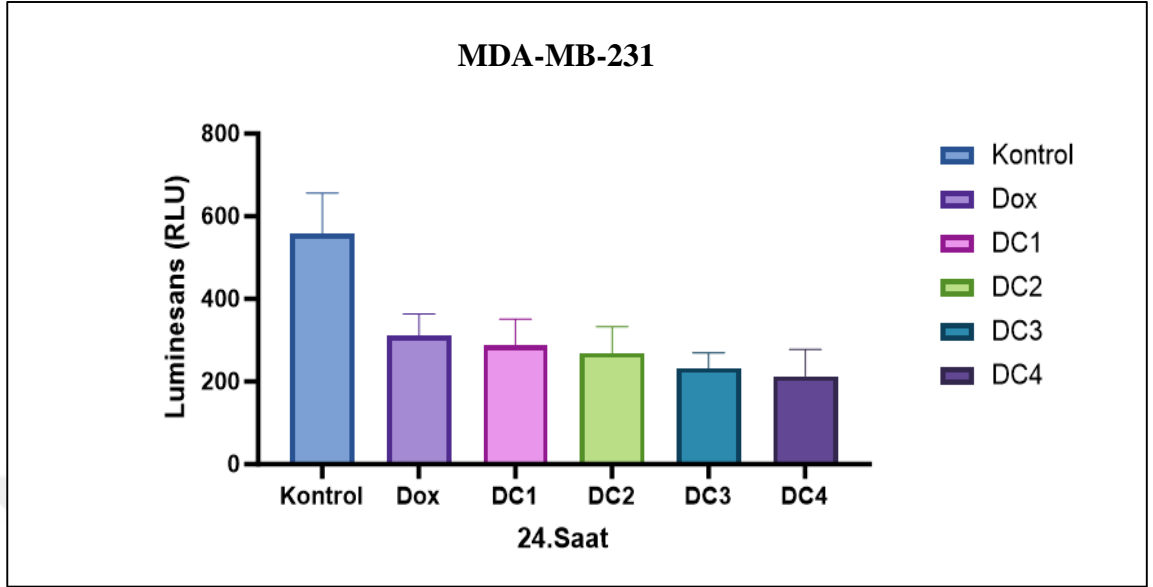
24'üncü saatte, CYP gruplarında CMT-U309 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). En düşük canlılık değerleri CC4 gruplarından elde edilmiş. Diğer etken grupları karşılaştırıldığında CC3 grubu neredeyse hiçbir uygulama yapılayan kontrol grubu ile benzer olup en yüksek canlılık değeri vermiştir. En yüksek antiproliferatif etki CC4 grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 3.5. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24. Saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata).

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
24. saat	751,00±3 6,69 ^c	386,66±1 5,50 ^a	530,66±1 6,41 ^b	596,33±5 0,40 ^b	770,00±8 3,17 ^c	380,66±2 0,17 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir.

DOX grubunda 24'üncü saate MDA-MB-231 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.13 ve Çizelge 3.6'da; kontrol grubuna göre % hücre antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.13. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB grupları 24'üncü Saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standard Sapma).

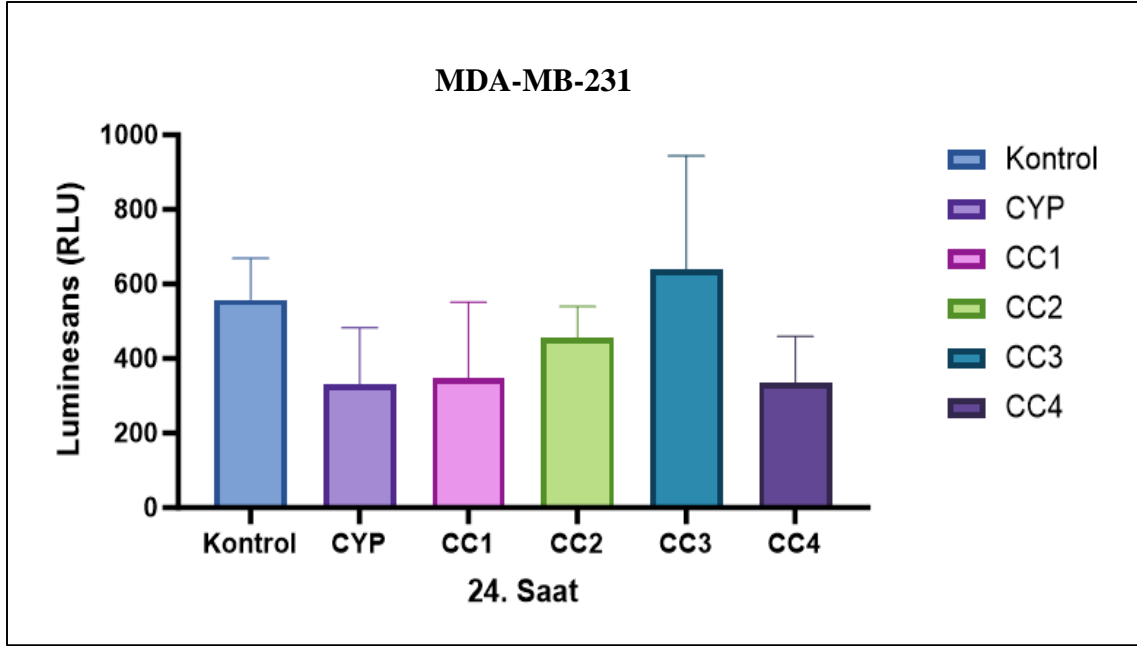
24'üncü saatte, Dox gruplarında MDA-MB-231 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). En düşük canlılık değeri DC4 grubunda elde edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Hücre antiproliferatif etki en yüksek DC4 grubunda bulunmuştur.

Çizelge 3.6. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB grupları 24üncü Saatte canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
24. saat	557,83±4 0,13 ^c	313,33 ±21,95 ^b	288,16±2 5,69 ^{a,b}	269,00±2 6,15 ^{a,b}	232,16±1 5,32 ^{a,b}	213,16±2 6,32 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

MDA-MB-231 hücre hattında 24'üncü saat içerisinde canlılık değerleri bakımından CYP etken grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark tespit edilememiştir ($p = 0,233$). İlgili istatistikler Şekil 3.14 ve Çizelge 3.7'de Kontrol grubuna göre hücre canlılığı yüzdesi ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



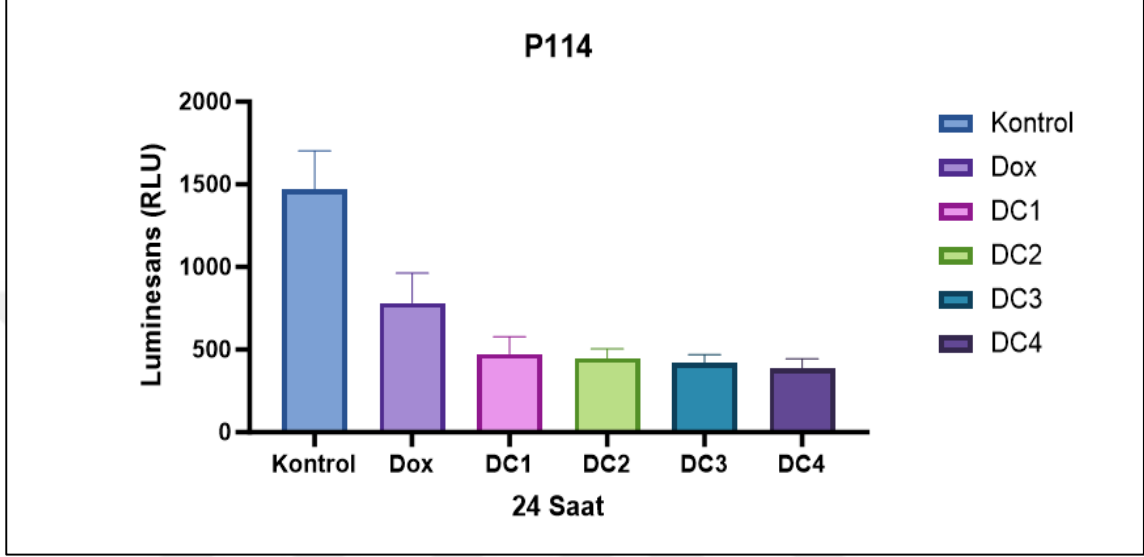
Şekil 3.14. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB grubu 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama \pm Standard Sapma).

24'üncü saatte, CYP gruplarında MDA-MB-231 hücre hattında en düşük canlılık değerleri CYP ve CC4 gruplarından elde edilmemesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. En yüksek antiproliferatif etki ise CC4 grubunda hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB grubu 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama \pm Standart Hata).

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
24. saat	639,00 \pm 1	329,33 \pm 8	347,33 \pm 1	456,33 \pm 4	558,00 \pm 6	335,00 \pm 7	0,233
	75,75	7,98	17,75	7,97	4,15	2,02	

Dox grubunda 24. Saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.15 ve Çizelge 3.8'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.15. P114 hücre hattında DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

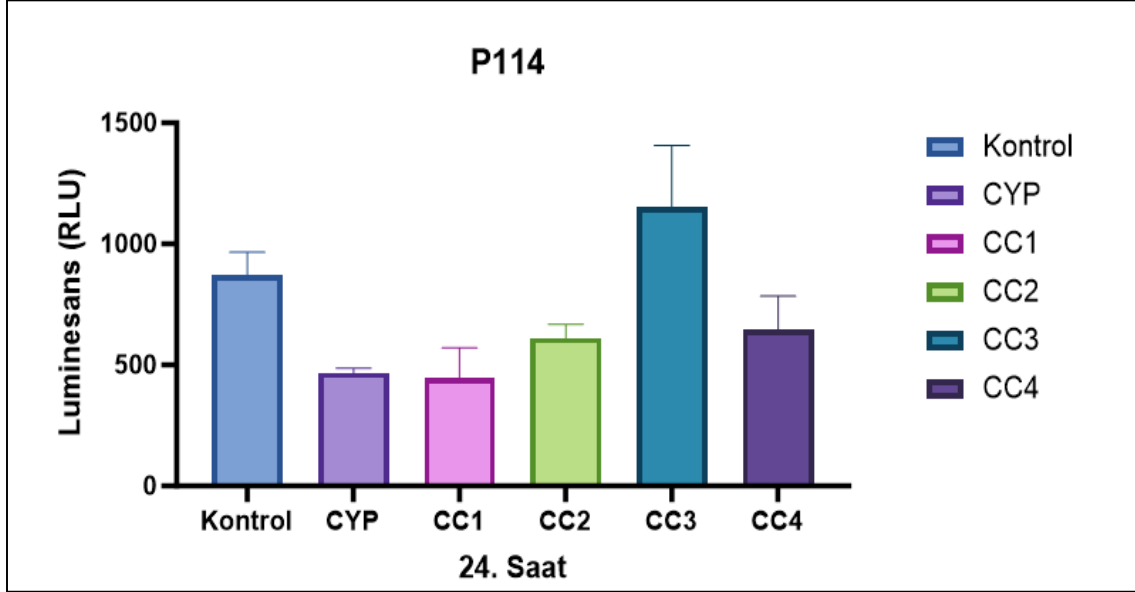
24'üncü saatte, Dox gruplarında P114 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir. ($p < 0,001$). Etken grupları incelendiğinde, DC3 ve D4 grupları önemli derecede farklılık göstermiştir. En yüksek antiproliferatif etki DC4 grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 3.8. P114 hücre hattında DOX+CXB gruplarında 24'üncü saatte canlılık değerleri (Ortalama ± Standart Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
24. saat	730,00 ± 4	495,00 ± 8	391,66 ± 3	360,83 ± 2	282,50 ± 2	259,83 ± 2	<0,001
	0,83 ^c	5,17 ^b	1,58 ^{a,b}	6,55 ^{a,b}	7,28 ^a	1,57 ^a	

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistikî olarak önemlidir.

CYP grubunda 24'üncü saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.16 ve Çizelge 3.9'da; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.16. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

24'üncü saatte, CYP gruplarında P114 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). En düşük canlılık değerleri CYP, CC1 ve CC2 gruplarından elde edilmiş; CC4 grubu ise ortalama değer sergilemiştir. En yüksek canlılık değeri CC3 grubundan elde edilmiş; hücre antiproliferatif etki bakımından değerlendirildiğinde en yüksek etki CC1 grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 3.9. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 24'üncü saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standart Hata).

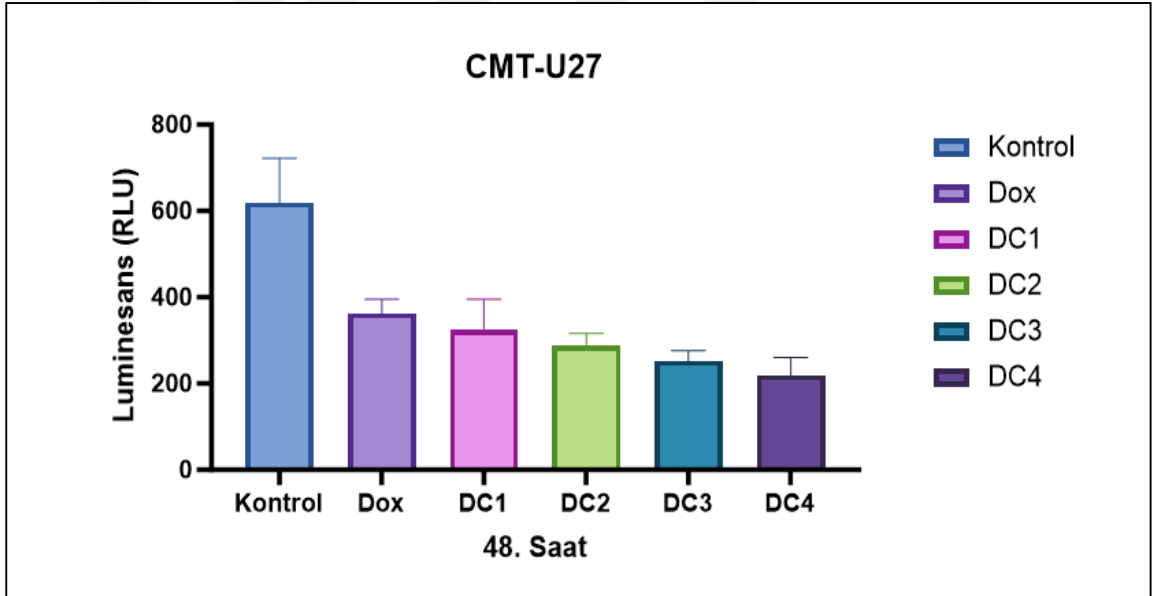
	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
24. saat	871,00 ± 5	466,66 ± 1	444,00 ± 7	610,00 ± 3	1150,00 ±	647,33 ± 7	<0,001
	4,64 ^b	0,66 ^a	3,20 ^a	3,84 ^a	148,00 ^c	9,20 ^{a,b}	

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir.

3.3.4. Selekoksib ve Kemoterapötik Kombinasyonu 48'inci Saat Bulguları

Çalışmada, Dox ve CYP'nin IC50 konsantrasyonları sabit tutularak, selekoksibin dört farklı dozu (DC1:DOX+25µM selekoksib, DC2:DOX+50µM selekoksib, DC3: DOX+75µM selekoksib, DC4:DOX+100µM selekoksib ve CC1: CYP+25µM selekoksib, CC2: CYP+50µM selekoksib, CC3: CYP+75µM selekoksib, CC4: CYP+100µM selekoksib) ile kombine uygulandıktan sonra COX-2 pozitif meme tümörü hücre hatlarının 48'inci saat değerleri incelenmiştir.

Dox+Selekoksisib grubunda 48nci saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.17 ve Çizelge 3.10'da; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.17. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB grupları 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma)

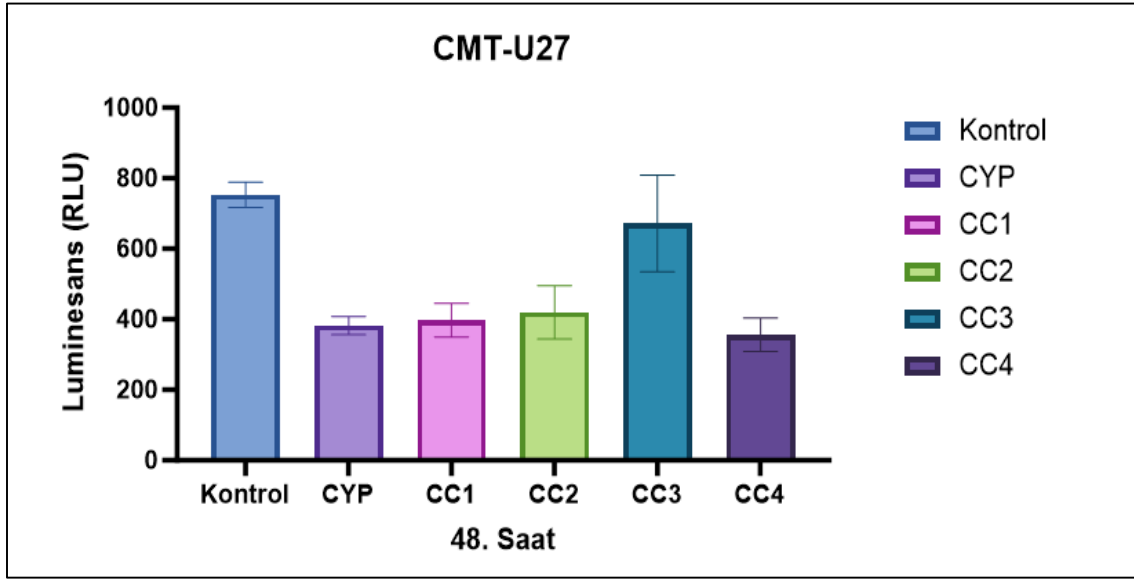
Çizelge 3.10. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB grupları 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
48. saat	618,83±42	362,16±13	325,16±28	288,16±11	252,33±10	218,50±16	
	,22 ^d	39 ^c	,66 ^{b,c}	,45 ^{a,b}	,06 ^a	7,77 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir.

48'inci saatte, Dox gruplarında CMT-U27 hücre hattında elde edilen canlılık değerleri bakımından etken grupları arasında yüksek düzeyde farklılık tespit edilmiştir ($p<0,001$). DC3 ve DC4 grupları diğer gruplardan farklılık göstermiş en yüksek antiproliferatif etki ise DC4 grubunda gözlenmiştir.

CYP grubunda 48'inci saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.18 ve Çizelge 3.11'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir



Şekil 3.18. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB grupları 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama \pm Standard Sapma)

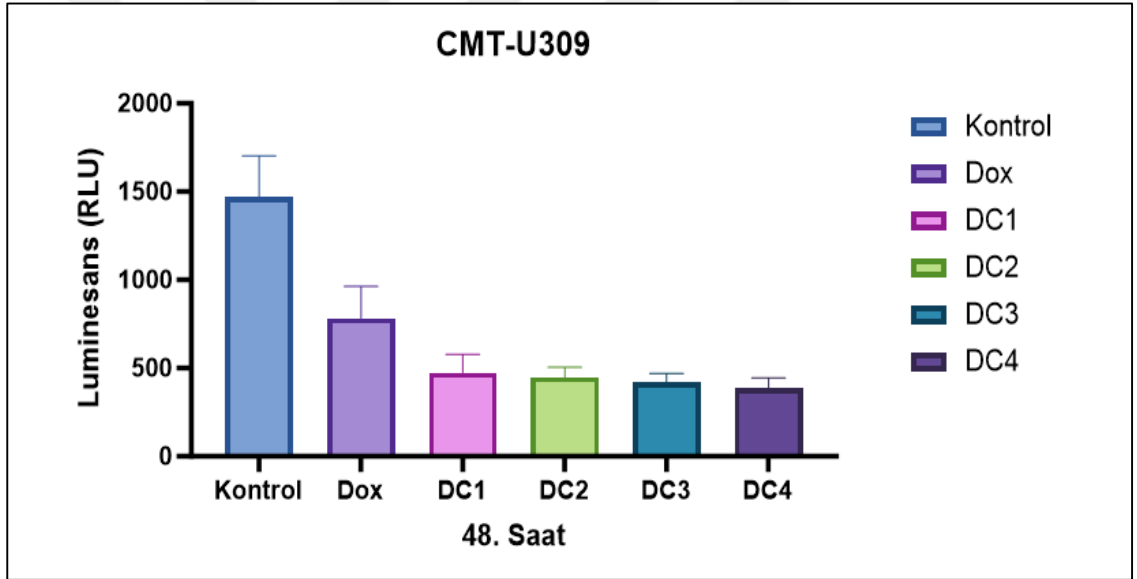
CYP grubu CMT-U27 hücre hattının 48'inci saat değerleri incelendiğinde etken grupları arasında yüksek derecede istatistiksel fark elde edilmiştir ($p<0,001$). CYP, CC1, CC2 ve CC4 benzer sonuçlar vermiştir. CC3 hücre canlılık değeri CYP, CC1, CC2 ve CC4 gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı farklılık göstermiştir. En yüksek antiproliferatif etki CC4 grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 3.11. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB grupları 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
48. saat	753,00±2 0,66 ^b	382,33±1 4,99 ^a	397,00±2 7,53 ^a	419,66±4 3,64 ^a	671,66±7 9,29 ^b	356,00±2 7,15 ^a	<0,001

a, b: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

Dox grubunda 48. Saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.19 ve Çizelge 3.12’te; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26’te verilmiştir



Şekil 3.19. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB grupları 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama ±Standart Sapma).

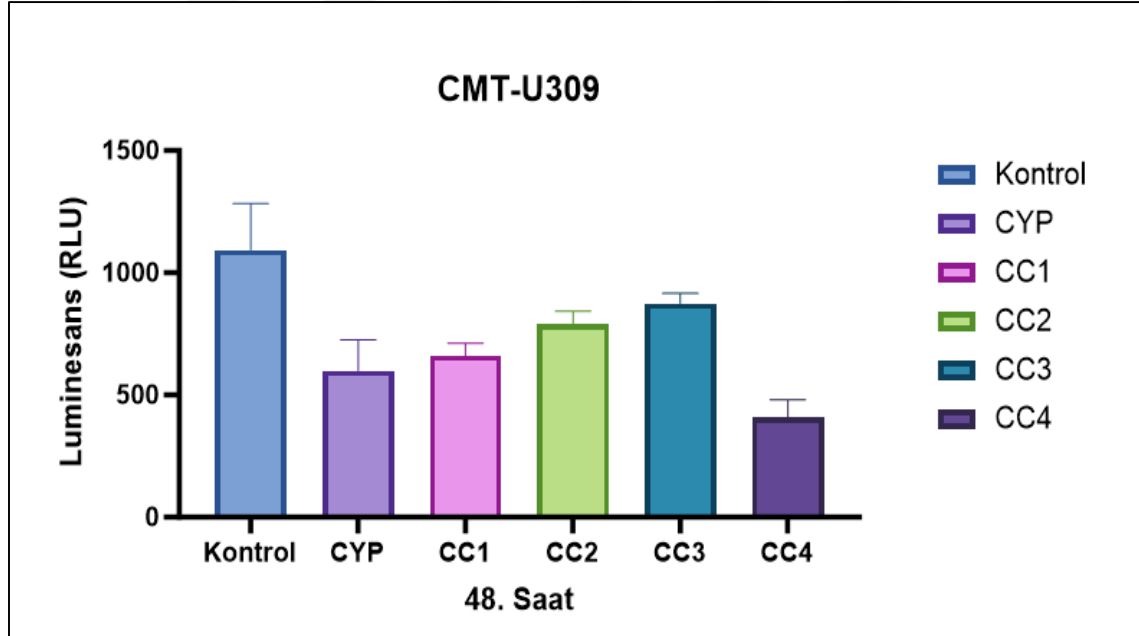
CMT-309 hücre hattının Dox grubunda 48’inci saat değerleri incelendiğinde etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark elde edilmiştir ($p < 0,001$). Etken grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında en düşük canlılık değeri DC4 grubunda gözlenmiştir. DC1, DC2 ve DC3 grupları bu iki gruptan farklı ancak ortalama bir değer sergilemiştir. Hücrenin antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında ise en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.12. CMT-U27 hücre hattı DOX+CXB grupları 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standard Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
48 saat	987,33±39 ,53 ^d	465,33±38 ,92 ^c	406,83±10 ,68 ^{b,c}	378,33±10 ,12 ^{a,b}	342,66±22 ,32 ^{a,b}	303,50±9, 73 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP grubunda 48’inci saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.20 ve Çizelge 3.13’de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27’de verilmiştir



Şekil 3.20. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB grupları 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

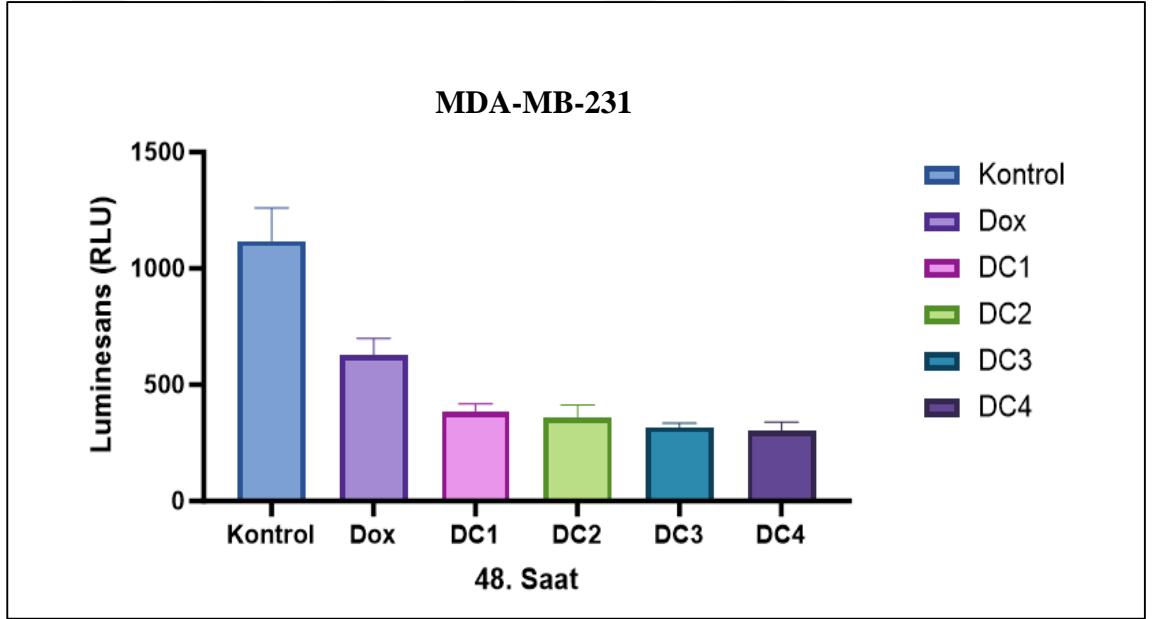
CMT-309 hücre hattının CYP grubunda 48’inci saat değerleri incelendiğinde etken grupları arasında istatikselsel olarak önemli düzeyde fark elde edilmiştir ($p < 0,001$). CC4 grubu en düşük canlılık değeri belirlenmiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında, en yüksek CC4 grubunda belirlenmiştir.

Çizelge 3.13. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB grupları 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
48. saat	1093,33± 109,91 ^d	599,33±7 2,84 ^b	661,00±2 9,44 ^b	788,00±0, 98 ^{b,c}	874,00±2 4,09 ^c	408,33±4 1,88 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

Dox grubunda 48’inci saatte MDA-MB-231 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.21 ve Çizelge 3.14’te; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26’da verilmiştir.



Şekil 3.21. MDA-MB-231 hücre hattı DOX-CXB gruplarında 48’inci saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

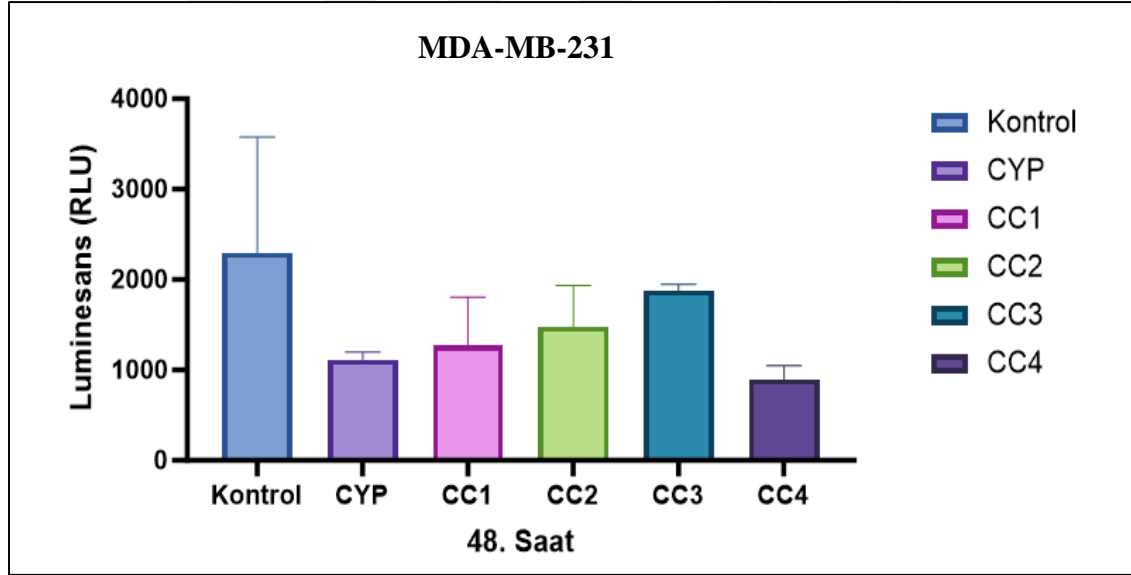
Dox grubunun 48’inci saat MDA-MB-231 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p < 0,001$). DC1, DC2, DC3 ve DC4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.14. MDA-MB-231 hücre hattı DOX-CXB gruplarında 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
48. saat	1118,00± 58,1 ^c	627,50±2 9,22 ^b	383,83±1 3,32 ^a	357,33±2 2,84 ^a	317,33±7, 22 ^a	301,50±1 5,41 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP grubunda 48'inci saatte MDA-MB-231 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.22 ve Çizelge 3.15'te; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



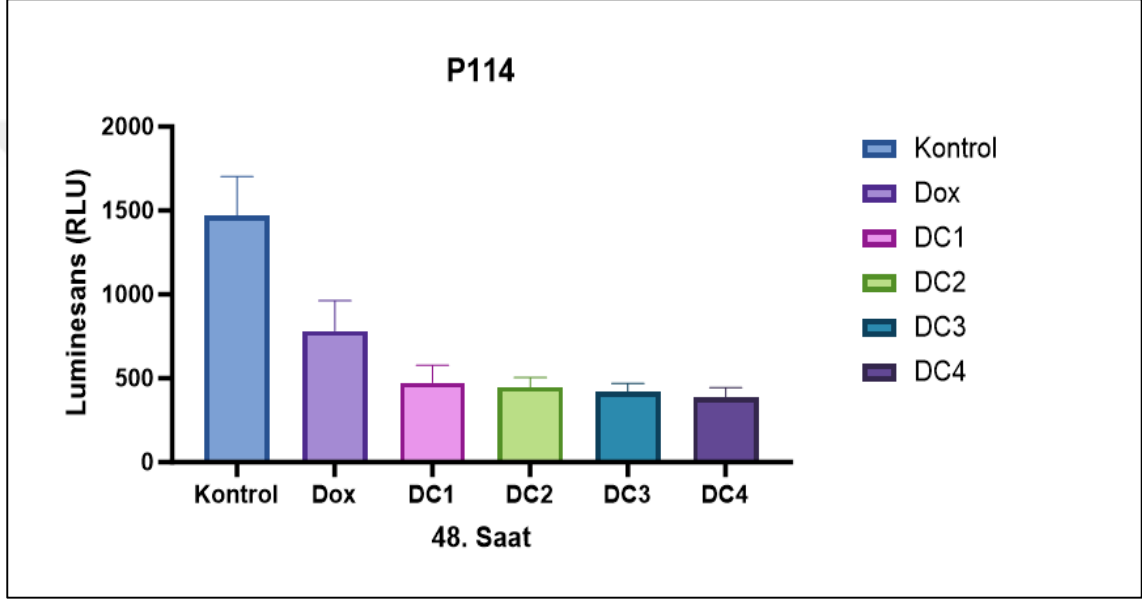
Şekil 3.22. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

CYP grubunun 48'inci saat MDA-MB-231 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmemiştir ($p < 0,120$). Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.15. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
48. saat	2294,33±7 39,64	1115,66±4 6,38	1267,00±3 11,13	1478,33±2 62,97	1878,66±3 9,54	899,33±84 ,05 ^b	0,120

DOX grubunda 48. Saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.23 ve Çizelge 3.16'da; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.23. Dox grubunda P114 hücre hattında 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama ± Standard Sapma).

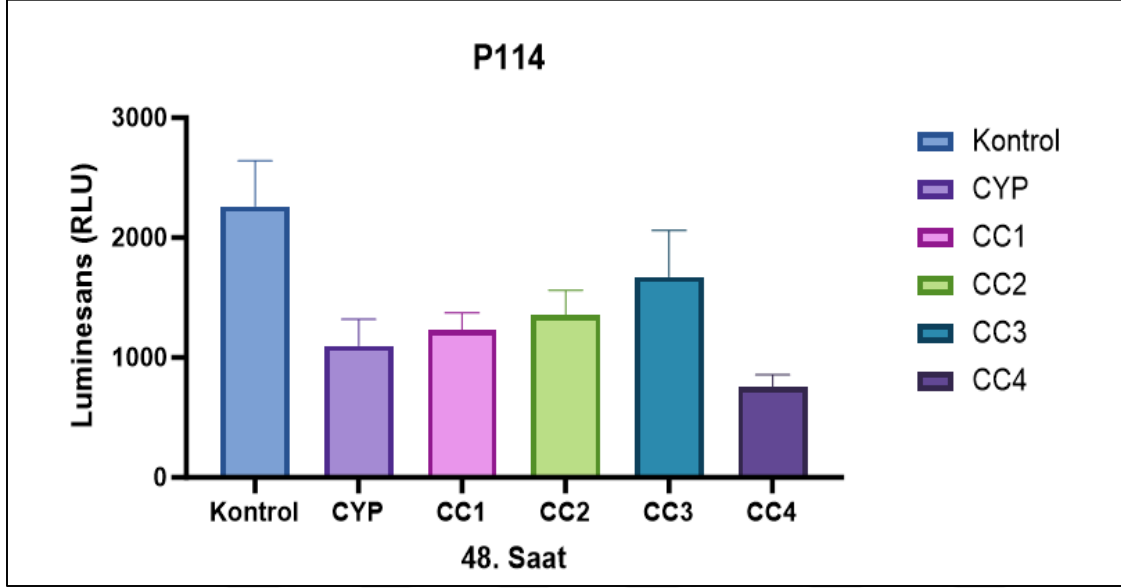
Dox grubunun 48'inci saat P114 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p < 0,001$). DC1, DC2, DC3 ve D4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.16. Dox grubunda P114 hücre hattında 48'inci saat canlılık değerleri (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
48. saat	1468,83± 9562 ^c	782,16±7 3,50 ^b	474,83±4 2,11 ^a	447,16±2 3,51 ^a	419,00±2 0,44 ^a	387,66±2 2,81 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP grubunda 48'inci saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.24 ve Çizelge 3.17'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir



Şekil 3.24. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 482inci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standard Sapma).

CYP grubunun 48. Saat P114 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p < 0,001$). CC4 grubu en düşük canlılık değeri belirlenmiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.17. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 48inci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

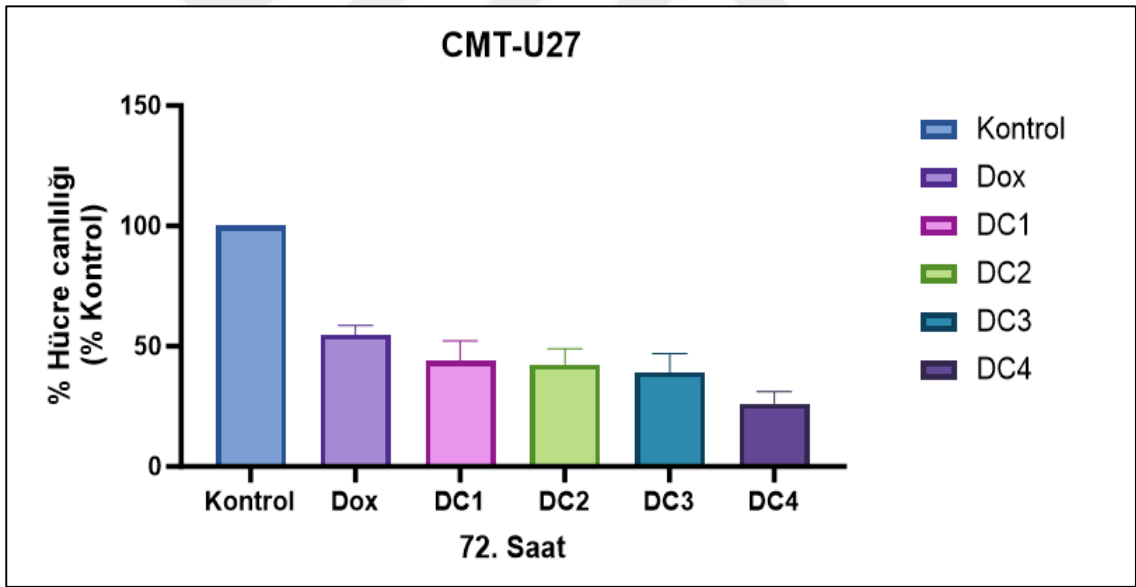
	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	p
48. saat	2260,00± 220,08 ^d	1099,33± 127,17 ^{ab}	1227,66± 83,33 ^{ab,c}	1354,66± 119,67 ^{b,c}	1674,00± 222,21 ^c	751,66±6 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

3.3.5. Selekoksib ve Kemoterapotik Kombinasyonu 72'nci Saat Bulguları

Çalışmada, Dox ve CYP'nin IC50 konsantrasyonları sabit tutularak, selekoksibin dört farklı dozu (DC1: DOX+25µM selekoksib, DC2: DOX+50µM selekoksib, DC3: DOX+75µM selekoksib, DC4: DOX+100µM selekoksib ve CC1: CYP+25µM selekoksib, CC2: CYP+50µM selekoksib, CC3: CYP+75µM selekoksib, CC4: CYP+100µM selekoksib) ile kombine uygulandıktan sonra COX-2 pozitif meme tümörü hücre hatlarının 72'nci saat değerleri incelenmiştir.

Dox+Selekoksisib grubunda 72'nci saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.25 ve Çizelge 3.18'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki değerleri ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.25. CMT-U27 hücre hattı DOX+CYP gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol)

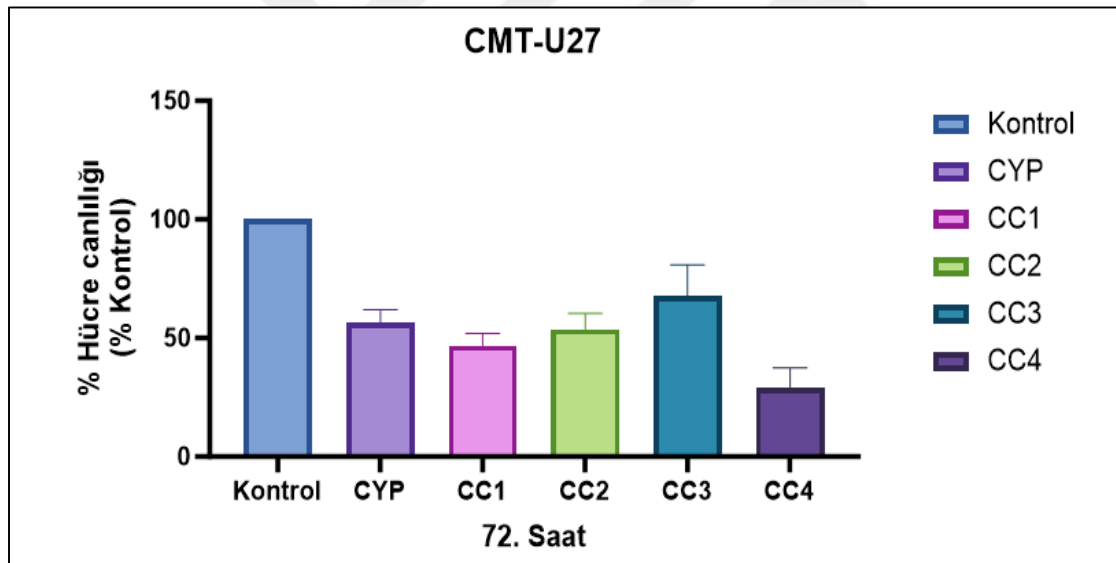
Dox+selekoksib grubunun 72'nci saat CMT-U27 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p < 0,001$). DC1, DC2, DC3 ve D4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.18. CMT-U27 hücre hattı DOX+CYP gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	P
72.saat	100,00±0, 0 ^d	53,46±1,4 1 ^c	43,86±7,4 2 ^{b,c}	42,43±2,3 6 ^{b,c}	39,12±6,4 8 ^b	26,12±1,8 5 ^a	* <0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir.

CYP+selekoksisib grubunda 72'nci saatte CMT-U27 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.26 ve Çizelge 3.19'da; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.26. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol)

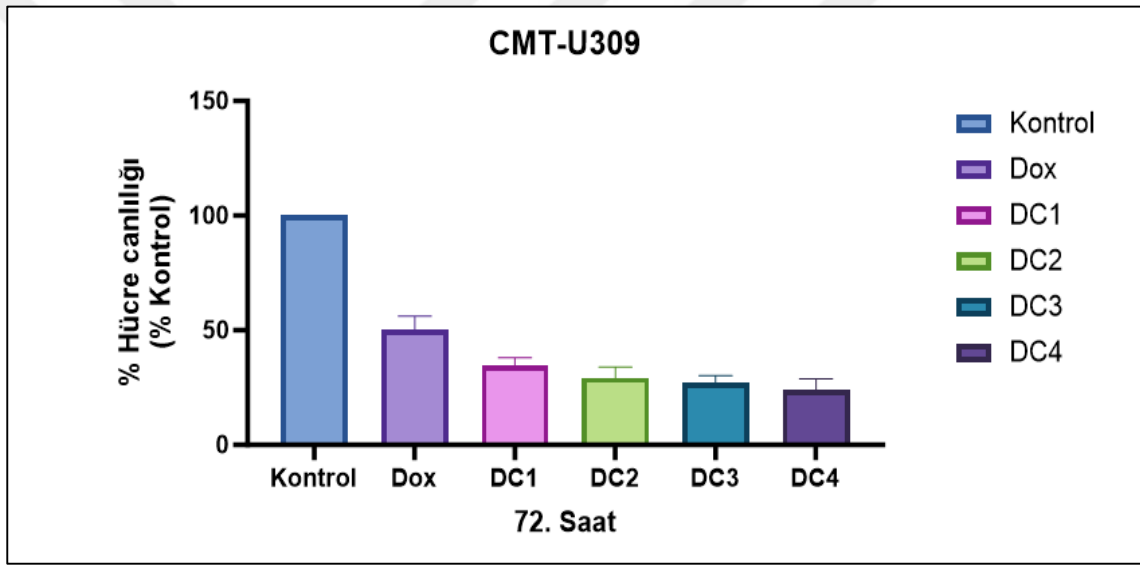
Çizelge 3.19. CMT-U27 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
72. saat	100,00±0, 00 ^e	56,53±2,2 1 ^c	46,80±2,1 1 ^b	53,73±2,6 7 ^{b,c}	67,55±5,4 1 ^d	28,80±3,4 7 ^a	<0,001

a, b, c, d, e: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir.

CYP grubunun 72'nci saat CMT-U27 hücre hattı değerleri incelendiğinde, CC1, CC2 ve CC3 kombinasyon grupları arasında benzer ve istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p<0,001$). CC4 grubu en düşük canlılık değeri belirlenmiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Dox grubunda 72'inci saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.27 ve Çizelge 3.20'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26'da verilmiştir



Şekil 3.27. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

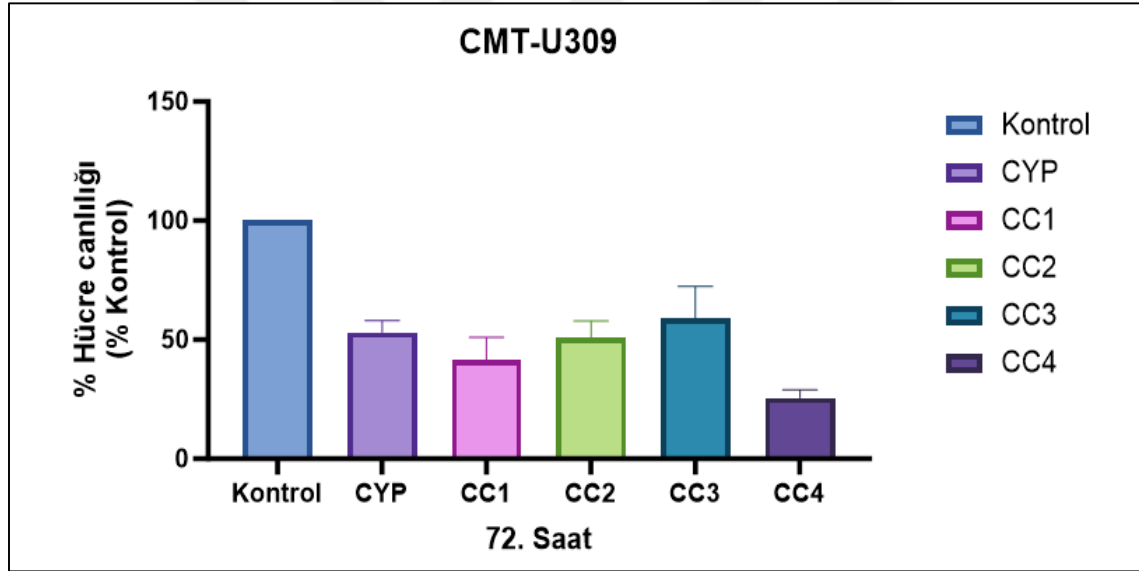
Dox+selekoksisib grubunun 72'nci saat CMT-U309 hücre hattı değerleri incelendiğinde, etken grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p<0,001$). DC1, DC2, DC3 ve D4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.20. CMT-U309 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	P
72.Saat	100,00±0,00 ^e	50,37±2,33 ^d	34,65±1,33 ^{a,b,c}	29,22±1,90 ^{b,c}	27,08±1,26 ^{a,b}	23,75±2,04 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

CYP grubunda 72'nci saatte CMT-U309 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.28 ve Çizelge 3.21'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir



Şekil 3.28. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

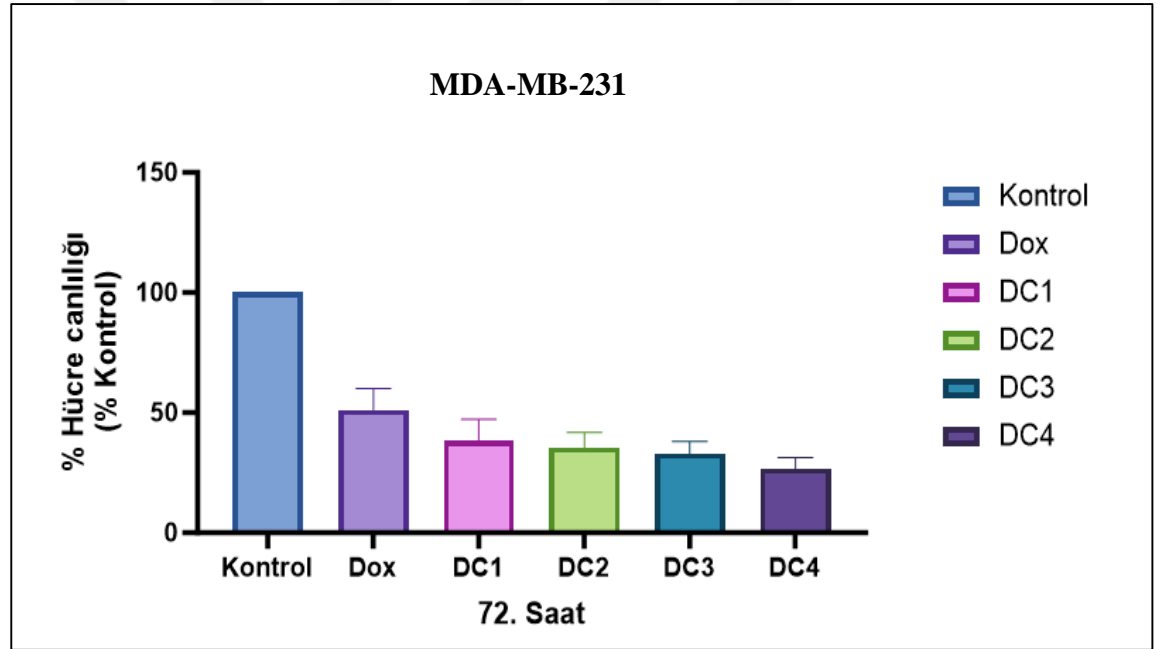
CYP+selekoksisib grubunun 72'nci saat CMT-U309 hücre hattı değerleri incelendiğinde, kombinasyon grupları arasında sadece CC4'de istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p<0,001$). CYP grubu ve CC1, CC2, CC3 grupları benzer ve istatistiksel olarak farklılık elde edilmemiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.21. CMT-U309 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
72.saat	100,00±0,00 ^c	53,11±14,23 ^b	41,34±3,91 ^{a,b}	50,63±2,94 ^b	59,07±5,40 ^b	25,56±4,66 ^a	<0,001

a, b, c: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

Dox grubunda 72'nci saatte MDA-MB-231 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.29 ve Çizelge 3.22'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26'da verilmiştir



Şekil 3.29. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

Dox+selekoksib grubunun 72'nci saat MDA-MB-231 hücre hattı değerleri incelendiğinde, kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p < 0,001$). DC2, DC3 ve D4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemekle birlikte DC1 grubunda istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

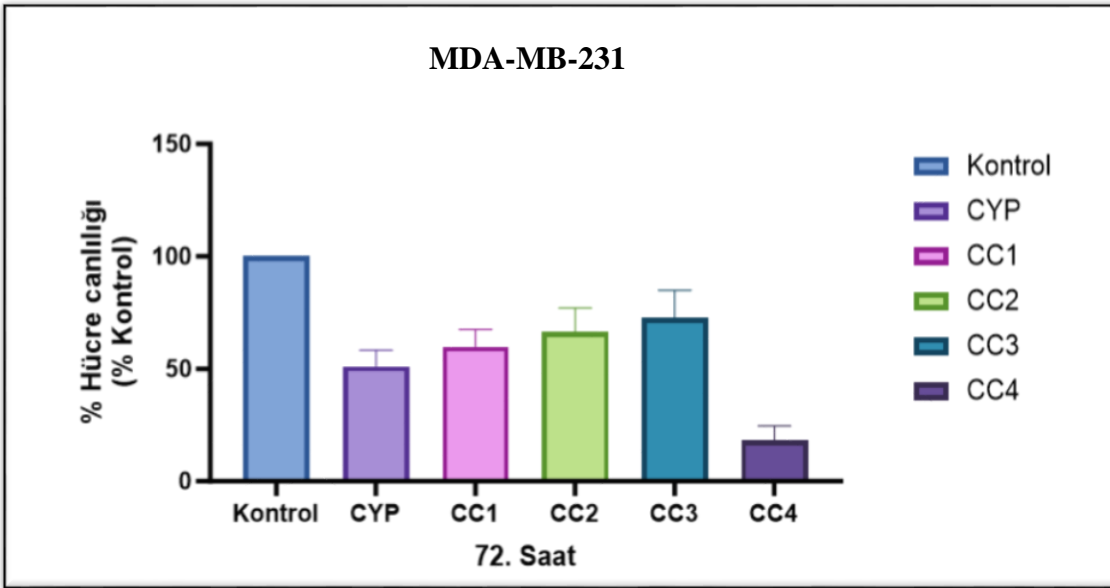
Çizelge 3.22. MDA-MB-231 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	P
72.Saat	100,00±0,00 ^d	51,24±3,57 ^c	38,48±3,53 ^b	35,46±2,56 ^b	32,88±2,04 ^{a,b}	26,65±1,87 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir.

Dox+selekoksib grubunun 72'nci saat MDA-MB-231 hücre hattı değerleri incelendiğinde, kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p<0,001$). DC2, DC3 ve D4 grupları benzer ve düşük canlılık değerleri sergilemekle birlikte DC1 grubunda istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

CYP grubunda 72'nci saatte MDA-MB-231 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.30 ve Çizelge 3.23'te; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir



Şekil 3.30. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

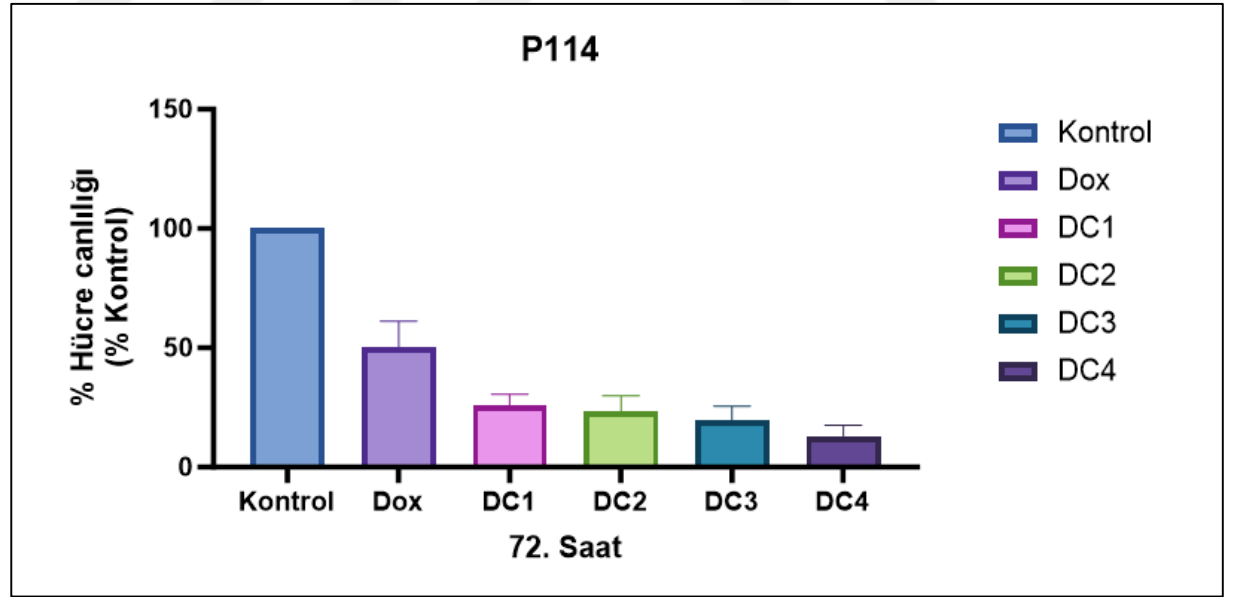
CYP+selekoksib grubunun 72'nci saat MDA-MB-231 hücre hattı değerleri incelendiğinde, tüm kombinasyon gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir ($p<0,001$). CC1, CC2, CC3 grupları kendi aralarında benzer fakat CC4 grubuna göre farklılık göstermişlerdir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.23. MDA-MB-231 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
72.saat	100,00±0,00 ^e	39,44±3,30 ^{c,b}	59,89±3,10 ^{b,c}	66,51±4,28 ^{c,d}	72,57±5,06 ^d	18,39±2,55 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

Dox grubunda 72'nci saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.31 ve Çizelge 3.24'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.31. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

DOX+selekoksib grubunun 72'nci saat P114 hücre hattı canlılık değerleri incelendiğinde, tüm kombinasyon gruplarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık elde edilmiştir

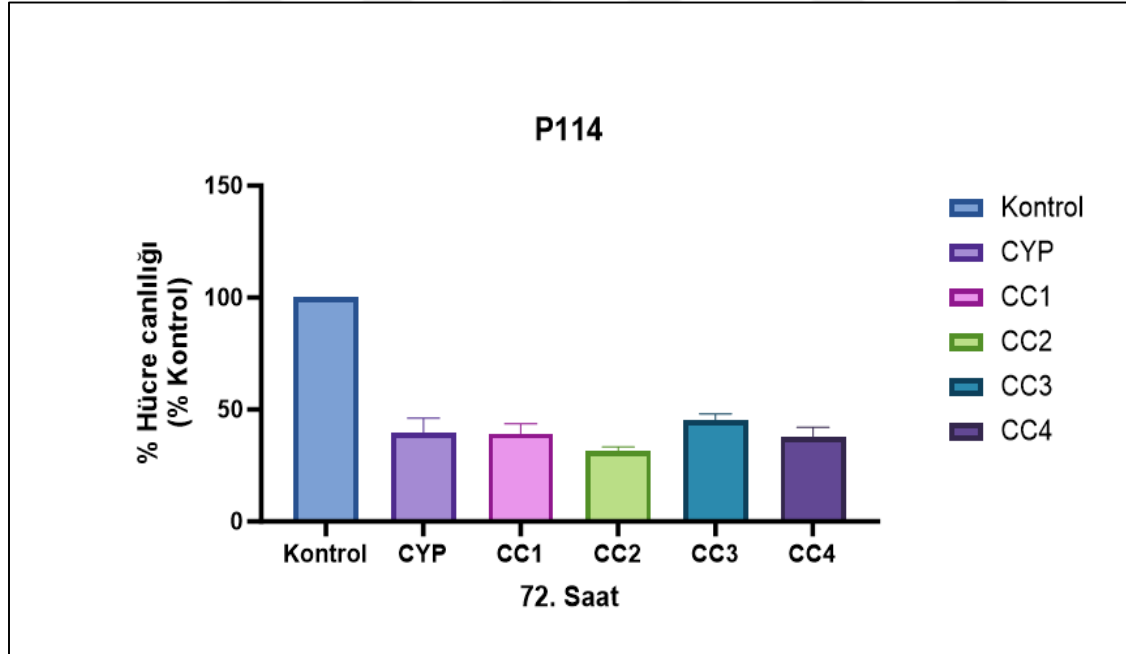
($p < 0,001$). DC1, DC2, DC3 grupları kendi aralarında benzer fakat DC4 grubuna göre farklılık göstermişlerdir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek DC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.24. P114 hücre hattı DOX+CXB gruplarında 72nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata).

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4	p
72.Saat	100,00±0,00 ^d	50,18±4,51 ^c	25,83±1,92 ^b	23,33±2,70 ^b	19,55±2,42 ^{a,b}	12,78±1,96 ^a	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir.

CYP grubunda 72'nci saatte P114 hücre hattında canlılık değerleri Şekil 3.32 ve Çizelge 3.25'de; kontrol grubuna göre % antiproliferatif etki ise Çizelge 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.32. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (% Kontrol).

CYP+selekoksisib grubunun 72'nci saat P114 hücre hattı değerleri incelendiğinde, CC4 kombinasyon grubu hariç diğer kombinasyon gruplarında istatistiksel olarak önemli bir

farklılık elde edilmemiştir ($p < 0,001$). CYP ve CC1, CC2, CC3 grupları kendi aralarında benzerlik gösterirken, CC4 grubu istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Hücre antiproliferatif etki kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek CC4 grubunda görülmüştür.

Çizelge 3.25. P114 hücre hattı CYP+CXB gruplarında 72'nci saat hücre canlılığı (Ortalama± Standart Hata)

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4	P
72. saat	100,00±0,00 ^d	51,13±2,94 ^b	39,21±2,17 ^b	31,37±0,94 ^a	45,04±1,49 ^c	37,74±2,15 ^b	<0,001

a, b, c, d: aynı satırda farklı harf bulunan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki olarak önemlidir.

DOX+CXB (Çizelge 3.26)ve CYP+CXB (Çizelge 3.27) kombinasyon gruplarında, P114, CMT-U27, CMT-U309 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24, 48 ve 72'nci saatlerde kontrol ve taşıt madde kontrol grubuna göre % antiproliferatif etkileri değerlendirilmiştir.

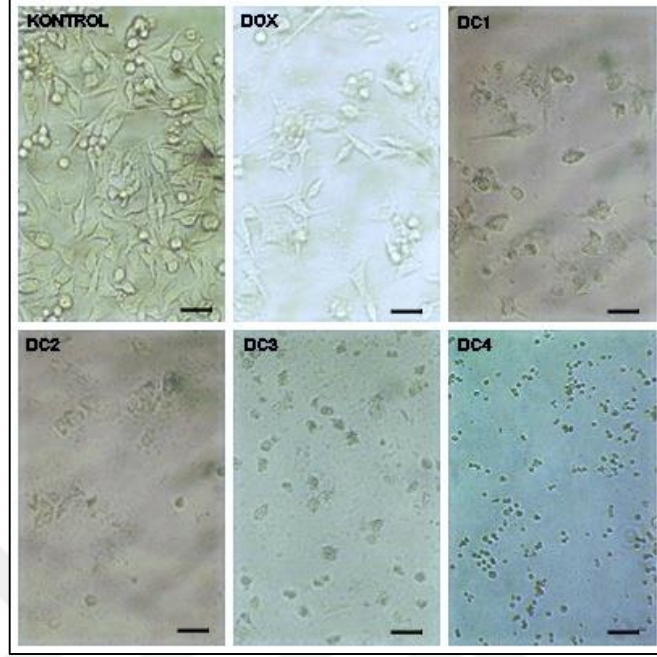
Çizelge 3.26. DOX+CXB kombinasyon gruplarında, P114, CMT-U27, CMT-U309 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24, 48 ve 72'nci saatlerdeki % antiproliferatif etkileri.

	Kontrol	Dox	DC1	DC2	DC3	DC4
24ncü saat						
P114	0	32,19	46,35	50,57	61,3	64,41
CMT-U27	0	38,28	41,51	48,61	56,8	62,99
CMT-U309	0	29,57	36,07	42,2	46,97	52,47
MDA-MB-231	0	43,87	65,67	68,04	71,62	73,03
48nci saat						
P114	0	46,75	67,67	69,56	71,47	73,61
CMT-U27	0	41,48	47,45	53,43	59,22	64,69
CMT-U309	0	52,87	58,79	61,68	65,29	69,26
MDA-MB-231	0	43,87	65,67	68,04	71,62	73,03
72nci saat						
P114	0	49,82	74,17	76,67	80,45	87,21
CMT-U27	0	45,22	56,14	57,57	60,87	73,87
CMT-U309	0	49,62	65,34	70,76	72,91	76,24
MDA-MB-231	0	48,76	61,51	64,54	67,11	73,34

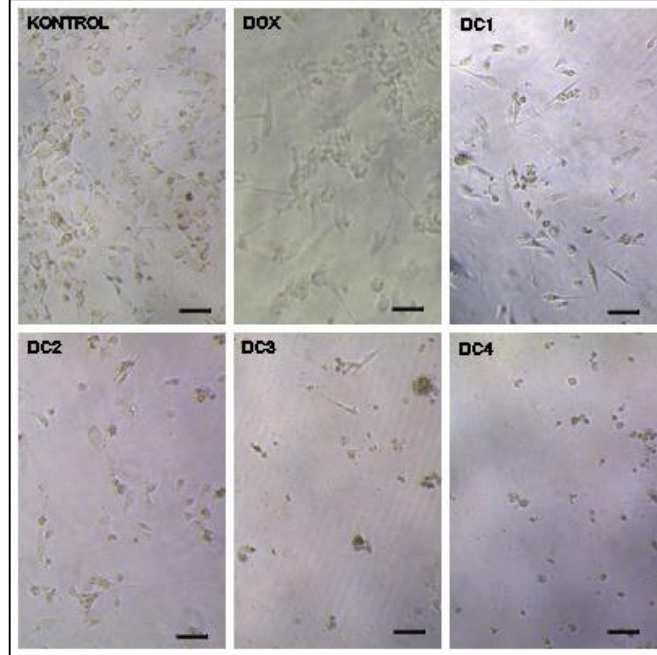
Çizelge 3.27. CYP+CXB kombinasyon grubunda, P114, CMT-U27, CMT-U309 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24, 48 ve 72'nci saatlerde kontrol ve taşıt madde kontrol grubuna göre % antiproliferatif etkileri.

	Kontrol	CYP	CC1	CC2	CC3	CC4
24ncü saat						
P114	0	46,42	49,02	29,97	-32,03	25,68
CMT-U27	0	45,36	44,06	41,4	-20,22	46,9
CMT-U309	0	48,51	29,34	20,59	-2,53	49,31
MDA-MB-231	0	40,98	37,75	18,22	-14,52	39,96
48nci saat						
P114	0	51,36	45,68	40,06	25,93	66,74
CMT-U27	0	49,23	47,28	44,27	10,8	52,72
CMT-U309	0	45,18	39,54	27,93	20,06	62,65
MDA-MB-231	0	51,37	44,78	35,57	18,12	60,80
72nci saat						
P114	0	60,56	60,79	68,63	54,95	62,26
CMT-U27	0	43,46	53,20	46,27	32,45	71,19
CMT-U309	0	46,89	58,65	49,37	40,93	74,44
MDA-MB-231	0	48,87	40,10	33,48	27,42	81,61

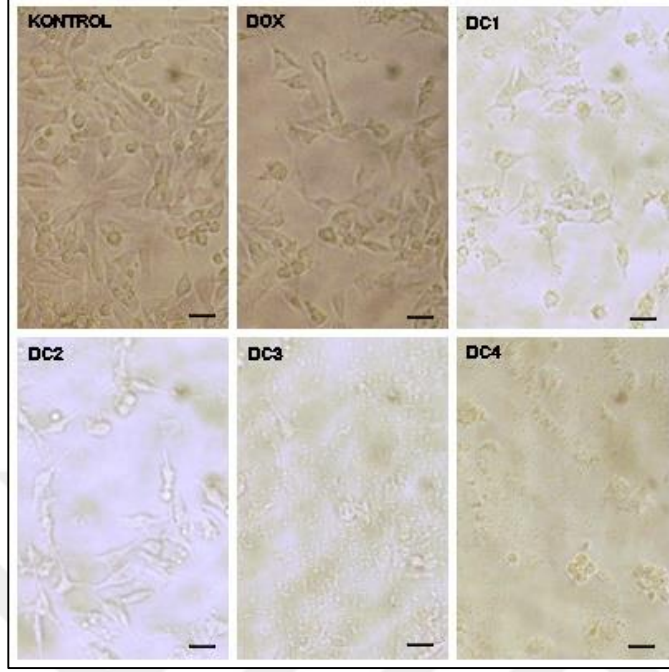
Leica DFC295 kamera eklentili inverted mikroskop ile çekilen, CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularına ait fotoğraflar sırasıyla Şekil 3.33, 3.34, 3.35 ve 3.36'da verilmiştir.



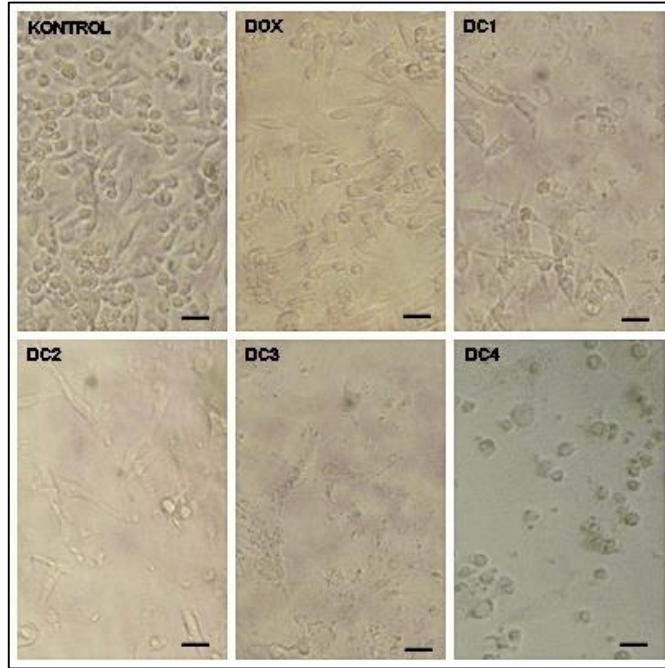
Şekil 3.33. CMT-U27 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.



Şekil 3.34. CMT-U309 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

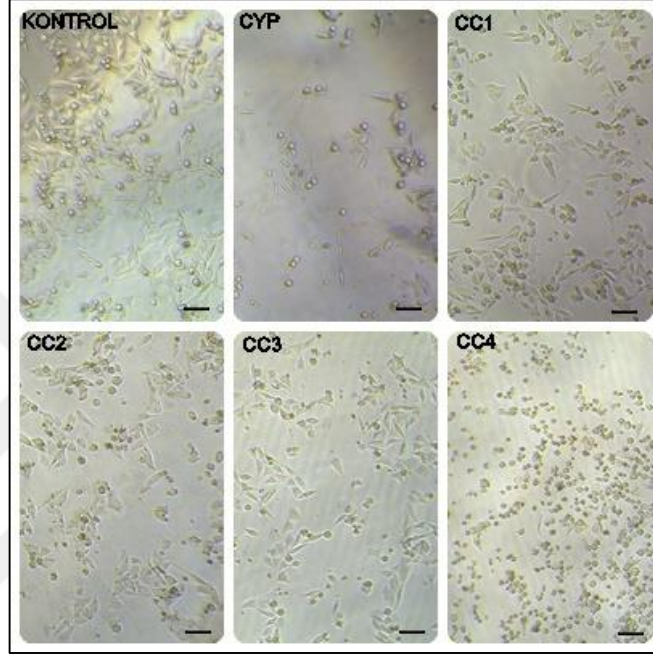


Şekil 3.35. P114 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

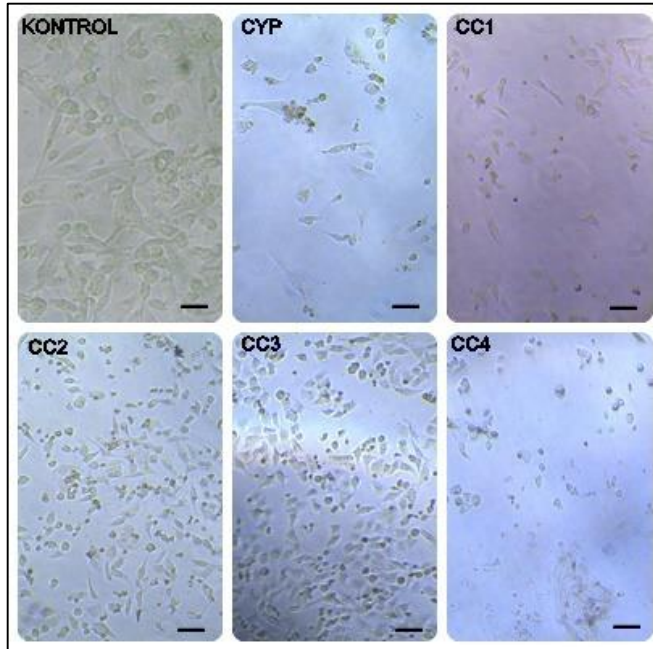


Şekil 3.36. MDA-MB-231 hücre hattına DOX+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

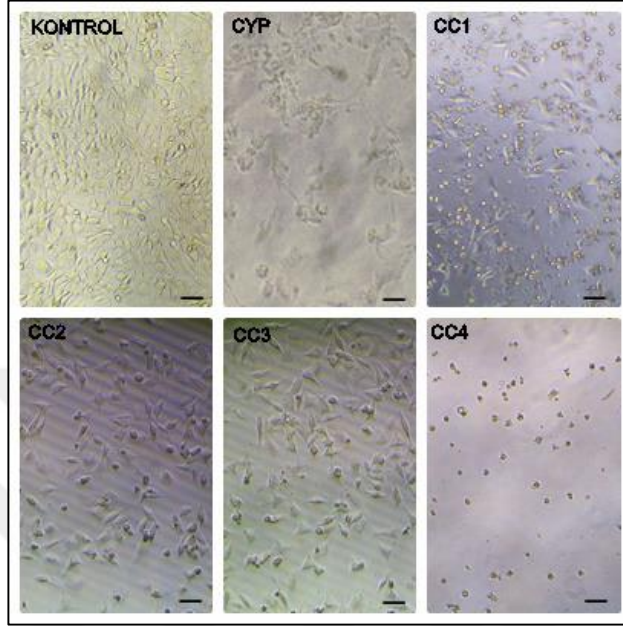
Leica DFC295 kamera eklentili inverted mikroskop ile çekilen, CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularına ait fotoğraflar sırasıyla Şekil 3.37, 3.38, 3.39 ve 3.40'da verilmiştir.



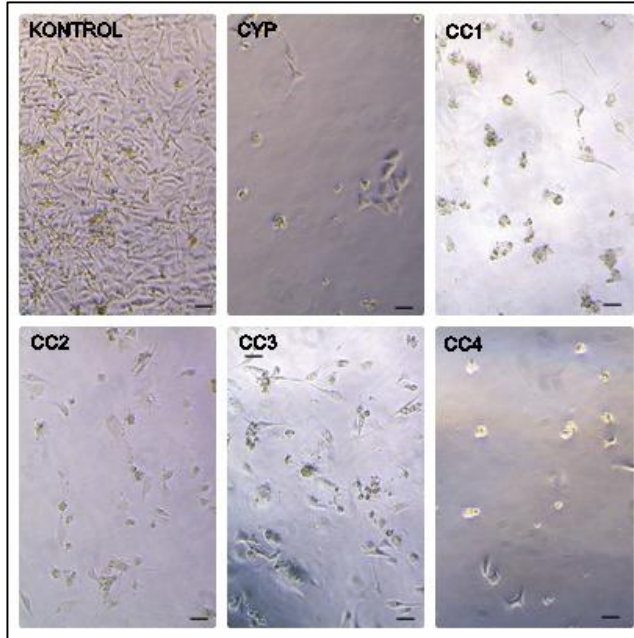
Şekil 3.37. CMT-U27 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.



Şekil 3.38. CMT-U309 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.



Şekil 3.39. P114 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.



Şekil 3.40. MDA-MB-231 hücre hattına CYP+CXB kombinasyon uygulamalarının 72'nci saat bulgularının fotoğrafları.

4. TARTIŞMA

Meme tümörleri; hem insanlarda hem de köpeklerde geliştirilen birçok yeni tedavi yöntemine karşın halen en sık görülen ve yüksek ölümlü sonuçlanabilen kanser türlerindedir. İlaç geliştirme stratejileri, yeni aday kemoterapötiklerin geliştirilmesinin yanı sıra, mevcut ilaçların tek başına kullanıldıklarında elde edilen etkinlikten daha yüksek etkinliğe sahip olabilecek yeni ilaç kombinasyonlarının keşfini içerir. Farklı antitümöral etki mekanizmaları üzerinden çalışan ve aralarında ilaç-ilaç etkileşimi bulunmayan farklı moleküllerin kombinasyonu, hem daha yüksek tedavi edici etkinlik hem de olası olumsuz yan etkilerinden kaçınılması mümkün görünmektedir. Ayrıca, tek başına kullanılanlardan daha düşük dozları ile oluşturulan ilaç kombinasyonları ile tedavide seçici etkinliğin artırılması ve kemoterapinin istenmeyen yan etkilerinin önüne geçilebilmesi sağlanabilir (Lu ve Mahato., 2009).

Sunulan bu çalışmada, in-vitro koşullarda farklı düzeylerde COX-2 eksprese eden köpek ve insan meme tümörü hücre hatları üzerinde COX-2 inhibitörü olan selekoksib ve kemoterapötik ajanların (DOX ve CYP) tek başına ve kombinasyon halindeki antitümöral etkileri değerlendirilmiştir.

Yakın zamanda canlı ve ölü hücre sayılarının "gerçek zamanlı" olarak sürekli olarak izlenmesine olanak tanıyan MTT'ye ek alternatif canlılık ve sitotoksikite yöntemleri geliştirilmiştir. RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılığı Testi, MTT testi ile kıyaslandığında çok daha hassas, hızlı ve tek bir plakada gerçek zamanlı sürekli okumalara olanak sağlamaktadır. Ayrıca, MTT reaktifinin sitotoksik etkileri deney sırasında hücrelere zarar verebileceği ve hatta ökaryotik hücrelere toksik olduğu rapor edilmiştir (Riss, Moravec ve Niles, 2013). Tüm bunlara ek olarak, RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılığı Testi, reaktif hücreleri öldürmediği için bir plakada multiple testler (apoptozun saptanması, RNA'nın çıkarılması, stres yanıt işaretleyicilerinin saptanması, ölü hücrelerin saptanması vb.) olanak sağlaması büyük bir avantajdır (Riss, 2017).

Yapılan bu çalışmada hücre canlılıkları RealTime-Glo™ MT ve MTT testi kullanılarak tespit edilmiştir. 24 ve 48nci saat uygulamaları RealTime-Glo™ MT ile değerlendirilirken, 72nci saat bulgularında tedavi gruplarıyla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu hücrelerinde de çoğalmanın doğrusallığı bozulduğu için MTT testine geçiş yapılmıştır. RealTime-Glo™ MT Hücre Canlılığı Testi, biyoluminesan bir yöntemdir ve canlı hücrelerin, NanoLuc® lusiferaz için bir substrat oluşturmak üzere MT hücre canlılığı prosubstratını indirgemesine dayanır. Bu substrat hücrelerden çevredeki kültür ortamına yayılır ve burada NanoLuc® enzimi tarafından luminesan bir sinyal üretmek için hızla kullanılır. Kanser hücre hatlarının çok hızlı bölünmesi sebebiyle 72nci saatte ortamda yeterli substratın kalmadığı ve doğrusallığın bozulduğu düşünülerek 72nci saat sonuçları ayrı olarak MTT testi ile değerlendirilmiştir.

Prekanseroz ve malign dokularda, COX-2 ifadesinin, yangıda olana benzer şekilde arttığı gösterilmiştir (Harris vd., 2014). Yangıyla eş zamanlı olarak; endotel, epitel, stromal hücreler, monosit ve lenfositlerde COX-2 ifadesi ve PGE-2 üretimi, bazal seviyenin 100 katına kadar yükselir. COX-2 geninin yukarı regülasyonu ve PGE-2'nin sürekli biyosentezi, başta meme olmak üzere birçok kanser gelişiminde geri dönüşsüz bir şekilde bağlantılı görünmektedir (Wu ve Zhou, 2010). COX-2 enflamatuvar kaskadının artması, proinflatuar uyaranlara maruz kalan hücrelerin hücre membranlarındaki toll benzeri reseptörler tarafından tanınması ve NF- κ B'nin aktivasyonu ile tetiklenir. Kanserde NF- κ B'nin aktivasyonu hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi artırırken, apoptozun baskılanmasına neden olur (Park ve Hong., 2016).

Köpeklerden izole edilen ve ölümsüz hücre serileri oluşturularak, laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan CF33, CF41, CMT-9, CMT-12, CMT-28 köpek meme tümörü hücrelerinin COX-2 ifadesi gösterdikleri, bunlar arasından CMT-12'nin güçlü COX-2 ifadesi gösterirken, diğer hücre hatlarının düşük ifade seviyelerine sahip oldukları tanımlanmıştır (Brunelle vd, 2006). Bu çalışmada kullanılan köpek meme tümör hücreleri CMT-U27, CMT-U309 ve P114 COX-2 pozitif olarak bilinirler (Visan vd., 2016). Yukarıdaki üç hücre hattı ve ilave olarak MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin, COX-2 ifade seviyeleri western blot tekniği ile gösterilmiş ve sırasıyla P114, CMT-U27 ve MDA-MB-231'de COX-2 ifadesi yüksek, CMT-U309 ise düşük seviyeded COX-2 ifadesine sahip olduğu bulunmuştur.

Bununla birlikte; farklı hücre hatlarının sadece farklı düzeyde COX-2 eksprese etmediği aynı zamanda farklı kemoterapötiklere ve kombinasyonlara karşı farklı yanıtlar da şekillendirdiği görülmüştür (Li vd.,2020). Selekoksinin farklı dozlarının tek başına ve kemoterapötik ajanlarla kombine edildiğinde hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde; yüksek COX-2 ifadesine sahip hücre hatlarında selekoksinin doksorubisin ile kombinasyonlarında, tümör hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir. Nitekim; son yıllarda selekoksinin antineoplastik etkileri üzerine yapılan araştırma çalışmalarının sayısı önemli ölçüde artmaktadır. Bu araştırmaların büyük çoğunluğu, etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik prelinik çalışmalara aittir. Selekoksin ile ilgili çalışmalar öncelikle kolon, meme, akciğer, prostat, mide, baş ve boyun kanserlerinin yanı sıra ailesel adenoma polipozis gibi premalign lezyonların tedavisine odaklanmıştır (Yang vd., 2020; Perroud vd., 2015; Kerschbaumer vd., 2015; Chen vd., 2015; Kong vd., 2016). Sunulan çalışmada; özellikle kemoterapötik ajanlarla selekoksin kombinasyonunun değerlendirildiği sonuçlar dikkat çekici bulunmuştur. Doksorubisin ile yapılan kombinasyon tedavisi, tümör hücre proliferasyonunu daha yüksek oranda baskıladı ve DC4 grubunun (DOX+100 µM CXB) en yüksek antitümöral etkiyi gösterdiği görülmüştür ($p<0,001$). Bu özellikle; antitümöral tedavilerde tek başına kullanılan DOX dozunun düşürülmesini sağlayabilecek bir sonuç olarak görülmektedir. Çünkü DOX' un etki mekanizmasına bakıldığında; DNA'nın çift sarmalını ayırmaktan sorumlu bir enzim olan topoizomeraz II' yi inhibe eder ve DNA'ya interkalasyon yoluyla açılımına izin vererek sonuçta programlanmış hücre ölümüne neden olur. Aslında tercihi mitotik hücreler olsa da hücrenin hangi hücre döngüsü aşamasında olduğuna bakılmaksızın etkilerini gösterebilir (González vd., 2000). Bu özellikleriyle hem beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte meme tümörleri de dahil olmak üzere çok çeşitli karsinomlara karşı antitümöral olarak kullanılsa da, yaptığı miyelosupresyon, immünosupresyon ve doz-kümülatif kardiyotoksikite gibi akut ve kronik toksisiteler nedeniyle kullanımı sınırlıdır (Pang vd., 2011). Yapılan bu çalışmada da literatürle uyumlu biçimde; IC50 değerleri belirlenen hücre hatlarından özellikle P114 hücre hattında yüksek doksorubisin hassasiyeti gözlenmiştir ($p<0,001$). Doksorubisin dozunun düşürülmesini sağlayabilecek, toksik olmayan ilaçlarla kombinasyon protokolleri aramak amacıyla yapılacak in vivo ve in vitro testler önem arz etmektedir. Sunulan bu

çalışmadada, DOX ile yapılan kombinasyon tedavilerinin, sadece kemoterapiye kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Özellikle, doksorubisin ve selekoksib kombinasyonunun P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında en yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

In-vitro deneylerde, doksorubisin IC50 dozu sabit tutularak, selekoksibin artan konsantrasyonları, çalışmada yeralan tüm meme kanseri tümör hücreler üzerinde antitümöral etkinlik gösterdi ve daha da ilginç şekilde artan selekoksib konsantrasyonu ile antitümöral etkinlik arasında da doğru orantılı bir bağlantı bulunduğu tespit edildi. Bu, doksorubisinin hücre büyümesi ve bölünmesi üzerine olan etkinliği ile selekoksibin farklı bir yolak kullanarak tümör hücrelerini apoptoza sürükleyen etkisinin kombine edilmesi ile açıklanabilir görünmektedir. İki ilacın uygulama sonrası 24'üncü saatte antitümöral etkisi, 48 ve 72'nci saatlerde de benzer şekilde devam etmektedir. Dolayısıyla, COX-2 ifadesi pozitif meme kanseri olgularında, doksorubisin tedavisi ile birlikte NSAİD kullanımının, doksorubisinin kullanılan dozunun düşürülerek kardiyotoksikite gibi önemli yan etkilerinin azaltılmasında etkili bir seçenek olabileceği açıktır. Bu konuda CMT-U27 hücrelerinde gerçekleştirilen doksorubisin ve selekoksibin in birlikte uygulandığı araştırma sonuçlarına göre, doksorubisin IC50 dozu $0.9 \mu\text{M}$ iken, NSAİD kombinasyonu ile $0.245 \mu\text{M}$ 'a kadar düştüğü ortaya konulmuştur (Bakirel vd., 2016).

NSAİD tedavisi ile daha yüksek COX-2 ifadesine sahip köpek meme tümör hücrelerinde, düşük COX-2 ifadesi olanlara göre belirgin şekilde yüksek antitümöral etkinlik elde edilebileceğine dair karşılaştırılmalı ilk veriler bu araştırmayla birlikte gösterilmiştir. DOX ve CXB kombinasyonundan elde edilen bu sonuçların ışığında bu kombinasyonun anti proliferatif etkisinin hem CXB'nin dozuna hem de zamana bağlı olduğu ve köpek meme tümörlerinde anti proliferatif etki sağlayabilmek için DOX tedavisine CXB'nin eklenmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, CMT-U27 hücrelerinde tespit edilen antiproliferatif etkinlik ile CMT-U309 arasında fark olmaması, kullanılan hücre hatlarına göre ve dolayısıyla klinik meme kanseri hastaları arasında da varyasyonlar bulunabileceğini düşündürmektedir. Tümör hücrelerinin COX-2 ifade düzeyleri ve NSAİD etkinliği arasındaki korelasyonun doğrulanabilmesi için farklı COX-2 ifadesi gösteren diğer hücre serileri ile in-vitro deneylere devam edilmesi ve in-vivo

çalışmalarda kanserli hastaların COX-2 ifade düzeylerinin kantitatif olarak ayırt edilmesini sağlayacak yeni bir skorlama sistemine ihtiyaç duyulmaktadır.

Buna karşılık, sunulan çalışmada ilginç bir şekilde CYP'nin 25,50 ve 75 μM CXB ile kombinasyonunda CMT-U27, CMT-U309, P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının hepsinde hücre canlılığını artırmıştır ($p < 0,001$). Sırasıyla 25, 50 ve 75 μM 'lık kombinasyonlarda kademeli olarak arttırılan CXB dozuyla birlikte hücre canlılığı paralel bir artış göstermiştir. NSAİD'lerin siklofosfamid ve karboplatin ile kombinasyon yapıldığında intra-aditif etkileşimi girdiği kaynağından yola çıkarak antagonistik olduğu düşünülen bu iki ilacın birbirleriyle veya hedefleriyle etkileşime girerek ve dolayısıyla ilgili inhibitörlerin etkilerini azalttıkları dşnlmektedir (Robledo-Cadena vd., 2020)

Bununla birlikte, CYP+100 μM dozda ise tüm hücre hatlarında antiproliferatif etki gözlenmiştir. Bu yüksek doz selekoksib uygulamasının zaten hücredeki toksik sınırı aştığı ve dolayısıyla hücre ölümünü arttırdığı dşnlmektedir.

Aslında, bu tür ilaç kombinasyonları daha önce yumurtalık, akciğer karsinomu ve pankreatik adenokarsinom üzerinde klinik olarak test edilmiştir (Han vd., 2019). Ancak, kanser ilerlemesi durdurulamamış ve kanser hastalarının çoğu kötü sağkalım oranları göstermiştir (Foucquier vd., 2015). Belki de selekoksib ve karboplatin veya siklofosfamidin nispeten etkisiz olduğu bu tür olumsuz sonuçlar nedeniyle, yumurtalık/akciğer/pankreas karsinomları üzerinde daha fazla çalışma yapılması engellenmiştir. Mevcut bulgular, bu tür ilaç kombinasyonlarının infra-additif yanıtlar sağlaması beklendiğinden daha kötü sonuçlarla tutarlıdır. Selekoksibin kanser hücreleri için karboplatin/siklofosfamidin sitotoksitesini nasıl azalttığının açıklanabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu son bağlamda, CasII-gly'nin E vitamini analogları (α -TOS ve α -TEA) ile güçlü bir infra-additif etki gösterdiği belirtilmektedir; bunun nedeni muhtemelen bu ilaçların aynı bölgeleri/süreçleri (rneğin mitokondriyal fonksiyon) hedefleyerek birbirleriyle etkileşime girmesidir (Robledo-Cadena vd., 2020).

COX-2' yi aşırı eksprese eden kanser hücre hatlarına CYP ve NSAİD kombinasyon uygulanmasının tümör inhibisyonuna hiç etki etmediğini ya da tümör gelişimini teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Gao vd., 2021; Balraj vd., 2010). Gao ve ark.'larının yaptıkları diğer bir çalışmada in vitro Skuamöz Hücreli Kanser hücrelerinde COX-2 ifade

seviyesinin düşürülmesinin kanser hücreleri üzerinde çok az veya hiç etkisi olmadığını fakat tümör ksenograft çıplak fare modelinde, kanser hücrelerinin proliferasyonunu COX-2 yıkımı ile dramatik bir oranda azaltıklarını raporlamışlardır (Gao vd., 2021). Bu sonuçlar COX-2 inhibitörleriyle yapılan tedavi modellemelerinde, COX-2 ifade seviyesini düşürmekten ziyade tümör mikroçevresinde tümörögenezi baskılamanın daha etkili sonuçlar verdiğini desteklemektedir. Aslında, COX-2 ve PGE2' nin, sitotoksik T lenfositlerin aktivitesini bloke etmek için kanser hücrelerinden tümör mikro çevresine salındığı ve konak immünolojik tepkilerini bastırarak kanser hücrelerindeIDO1 ifadesiyle tümör gelişimini desteklediği düşünülmektedir (Hennequart vd., 2017).

COX-2 selektif inhibitörü olan selecoxib, 20 yılı aşkın bir süredir özellikle antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik ilaç olarak kullanılmaktadır. Selekoksib, COX-2'ye özgü bir inhibitördür ve COX-1 üzerinde sadece zayıf bir etkisi vardır. Diğer NSAİD'lerle karşılaştırıldığında, selekoksib daha düşük oranda gastrointestinal ve renal yan etkiye sahiptir (Tołoczko-Iwaniuk vd., 2019; Chen vd., 2011; van Wijngaarden vd., 2007). Yan etkisi diğer NSAİD'lere göre nispeten düşük olan bu anti-enflamatuvarın kemoterapotik ajanlarla kombinasyonu hem kemoterapotiklerin yan etkilerini azaltacak, hem de selektif COX-2 inhibitörü olması ile COX-2 salgılayan hücrelerde daha etkin bir tedavi protokolü oluşturulmasını sağlayabilecektir.

Sunulan bu çalışmada daha önce farklı kanser hücre hatlarında denenilen fakat düşük (CMT-U309) ve yüksek COX-2 ifadesine sahip köpek (CMT-U27, P114) ve insan meme tümörü (MDA-MB-231) hücre hatlarında doza bağımlı kombinasyonları denenmeyen CXB ve DOX veya CYP kombinasyonlarının bulguları da bu teoriyi destekler niteliktedir ve DOX ile CXB kombinasyonlarının COX-2 pozitif meme kanseri hücre hatlarında antitümöral etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Kombinasyon tedavilerinin 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür ($p<0,001$). Özellikle en yüksek antiproliferatif etki, doksorubisin ile yüksek doz selekoksib kombinasyonunda gözlenmiştir. Bu sonuçlar, COX-2 inhibitörünün kemoterapotik ajanlarla birleştirilmesinin sinerjistik etki yaratabileceğini ve tümör hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte; kombinasyon tedavilerinin uzun süreli etkileri de çalışmada ele alınmıştır. 72 saat sonrasında da doksorubisin ve selekoksib kombinasyonlarının antiproliferatif etkisinin

devam ettiği görülmüştür. Bu sonuç, kombinasyon tedavilerinin uzun dönemde tümör büyümesini kontrol etme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

Selekoksisib ile kombine edilerek kullanılan doksorubisin ve siklofosfamid etki mekanizmaları açısından temel farklılık, doksorubisinin topoizomeraz II inhibisyonu ile DNA replikasyonu ve DNA'dan RNA transkripsiyonunu engelleyerek hücrenin büyümesi ve replikasyonunu durdurması iken, siklofosfamidin DNA alkilleyicisi olarak non-selektif yolakla DNA ve RNA fonksiyonlarını engellemesidir. Burada, selektif COX-2 reseptör inhibitörü olarak kullanılan selekoksisib, hücre içi ve hücrelerarası birçok sitokin (PGE2, nfkB, IL1, IL6 vb) ve anjiyogenez (VEGF) mediyatörlerinin sentezi ve salıverilmesini azaltır. İn-vivo koşullarda tümör mikroçevresi içerisinde azalan bu mediyatörlerin tümör gelişimini durdurucu, hatta regresyonuna neden olan bu etki mekanizması açısından, invitro koşullar için aynısının söylenebilmesi çok da mümkün değildir. Çünkü farklı malign hücre serileri ile yapılan çalışmalarda, selekoksisib belirgin şekilde serbest oksijen radikallerinin seviyesinde artış ve mitokondiryal stres ile intrinsik apoptozu tetiklemektedir. Selekoksisibin tümör hücrelerinde apoptozu tetiklemesi, sunulan araştırmada kombine olarak kullanılan doksorubisin ve siklofosfamidin etki yollarından ayrı ve kombine etkinlikte artışın beklendiği bir ilaç yeniden konumlandırma tedavi protokolünü oluşturmaktadır. Selekoksisib ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında; tümör hücrelerinde Bax proteinlerinin ekspresyonunda artış ile birlikte, anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2 ve survivin gibi belirteçlerin ekspresyonunda azalmalar olduğu kanıtlanmıştır. Literatürde artık klasik bilgi olarak yerini alan, invitro koşullarda selekoksisib aracılı apoptoz mekanizmasının bu araştırmada tekrar gösterilmemesi, bir eksiklik olarak değerlendirilebilirdese, çalışmanın temel amaçları arasında yer verilmemiştir.

Selekoksisib'in antitümoral etkinliği hakkında birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, farklı kanser hücre hatları üzerinde kemoterapi ile kombinasyonlarının agonists/antagonist etkileri ve doz-yanıt ilişkisi iyi bir şekilde belgelenmemiştir. Selekoksisib, proliferasyonun inhibisyonu ve apoptozisin indüksiyonu yoluyla kanser hücreleri üzerinde anti-tümörjenik etkinlik gösterir. Fakat bu etkilerin farklı antikanser ilaçlarla farklı etkileşimli etkilerine, farklı ilaçların farklı etki mekanizmasına, farklı hücresel hedeflere ve hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonu üzerinde farklı etkilere sahip olduğuda gözönüne alınmalıdır.

Selekoksibin farklı hücre hatlarında aynı ilaçla kombine edildiğinde farklı etkileşimli etkiler gösterebileceği bulgusu, COX-2'nin farklı kanser türlerinde oynadığı farklı rol temelinde açıklanabilir. COX-2'nin birçok kanserin büyümesini ve ilerlemesini arttırdığı bildirilmiştir (Fosslien, 2000). Bu tür kanserler için COX-2 inhibitörleri terapötik fayda sağlar ve diğer antikanser ajanların etkinliğini artırabilir. Diğer kanserlerde, COX-2'nin pro-apoptotik ve tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Bol vd., 2002, Nakopoulou vd., 2005, Xu vd., 2006), bu da bu kanserlerde COX-2 inhibisyonunun tümör büyümesini artırabileceği, apoptozu inhibe edebileceği ve antikanser ilaçların etkisini antagonize edebileceği anlamına gelmektedir. Nitekim sunulan bu çalışma da, selekoksibin tek başına kullanımının hücre canlılığı üzerinde doza ve hücre hatlarına bağlı olarak farklı etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle yüksek COX-2 ifadesine sahip P114 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında selekoksibin tümör hücresi proliferasyonunu usurasıyla (% 60 ve % 55 oranında) azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak düşük COX-2 ifadesine sahip CMT-U309 hücre hattında düşük doz selekoksib uygulamasının antiproliferatif etki göstermediği görülmüştür. Bu sonuçlar, COX-2 ifade seviyesinin selekoksibin etkileri üzerinde önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Esas değinilmesi gereken konu ise, selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerindeki etkileridir. Siklofosfamidin hızlı hücre bölünmesine yol açan etkisi ve selekoksibin yangıyı kontrol ederek tümör büyümesini engellemeye çalışan mekanizması, bu iki ajanın birlikte kullanımının karmaşık etkileşimlerine işaret etmektedir. Özellikle P114 hücre hattında, selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun hücre büyümesini desteklediği gözlenmiştir ($p < 0,001$). Bu durum, farklı hücre hatları ve tümör özelliklerine bağlı olarak bu kombinasyonun farklı sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, COX-2 pozitif meme tümörü hücre hatlarında selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun farklı zaman noktalarında yapılan uygulamalarının değerlendirildiği sonuçlar da dikkat çekicidir. Özellikle 48. ve 72. saatlerde elde edilen canlılık değerleri, kombinasyonların etkilerinin zaman içinde nasıl değişebileceğini göstermektedir. Buna göre, CMT-U309 hücre hattında 48nci saatte CC4 grubunun en düşük canlılık değerine sahip olduğu ve en yüksek antiproliferatif etkinin bu grupta gözlemlendiği görülmüştür ($p < 0,001$). Benzer şekilde, P114 hücre hattında da 72nci saatte CC4 grubunun en düşük canlılık değerine sahip olduğu ve en yüksek antiproliferatif

etkinin bu grupta gözlemlendiği tespit edilmiştir. Hem literatür bilgilerinde hem de sunulan çalışmada gösterildiği üzere, CXB'nin aynı hücre hattında farklı antikanser ilaçlarla farklı etkileşimli etkileri, farklı ilaçların farklı etki mekanizmasına, farklı hücresel hedeflere ve hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonu üzerinde farklı etkilere sahip olmasıyla açıklanabilir. Bu nedenle, CXB'nin farklı antikanser maddelerle kombine edilmesi üzerine farklı etkilere sahip olması şaşırtıcı değildir.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışmada selekoksibin meme gibi bazı kanser türleri ve DOX gibi bazı antikanser ilaçlarla kombinasyonunda yüksek oranda antiproliferatif etki gösterirken, CYP ile kombinasyonunda başarılı olamayabileceğini gösterilmiştir.

Sunulan bu çalışmada, hem köpek hem de insana ait farklı düzeylerde COX-2 ekspresyon eden meme tümörü hücre hatları kullanılmış, farklı dozlarda verilen kemoterapötiklerin ayrı ayrı ve COX-2 inhibitörü ve antiinflamatuvar CXB ile kombinasyonlarının bu hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri zaman bağımlı değerlendirilmiştir.

Buna göre; DOX + CXB'nin birleşik uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığını, ancak CYP + CXB'nin kombinasyonunun farklı sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Doksorubisinin COX-2 inhibitörü olan CXB ile birlikte kullanılmasının, hücre büyümesini daha etkin bir şekilde engellediğini gösterilmiştir. Bu, doksorubisinin etkinliğinin COX-2 inhibitörü ile güçlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Ancak, CYP + CXB kombinasyonunun DOX + CXB kombinasyonunun aksine, hücre proliferasyonunu artırabildiği görülmüştür. Her iki ajanın farklı mekanizmaları, hücre büyümesini farklı yönlere yönlendirebilir. Özellikle P114 hücre hattında, selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun hücre büyümesini desteklediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, kemoterapi ajanları ile COX-2 inhibitörlerinin birleşik kullanımının hücre hatlarına ve tümör özelliklerine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Günümüzde kanser tedavilerinde en büyük sorunlardan biri, her kanser hastasına standart tedavilerin uygulanmasıdır. Oysa artık her hastanın tedavisinin kendine özgü olması gerçeği bilinmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar arasında önemli yer tutan onkogram testi, kemoterapi tedavisinin başlangıç aşamasında hastanın kanser hücrelerinin hangi

kemoterapötik ilaçlara duyarlı, hangilerine dirençli olduğunu saptayarak hastanın doğru tedaviye yönlendirilmesini sağlamaktadır (Williams vd., 2022).

Sonuç olarak, sunulan bu çalışma doksorubisin ve selekoksib kombinasyonunun antitümöral etkisini destekler nitelikteyken, selekoksib ve siklofosfamid kombinasyonunun farklı sonuçlar doğurabileceğini göstererek ilaç kombinasyonlarının karmaşıklığını ortaya koymaktadır. Bu tür sonuçlar, gelecekteki in-vivo ve klinik çalışmalar için yol gösterici nitelikteyken, özellikle veteriner hekimlikte tedavinin hasta (tür/cins) ve tümör bazlı değişebileceği bunun için bireysel uygun tedavi metodlarının geliştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Adelizzi, R. A. (1999). COX-1 and COX-2 in health and disease. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 99(11), 7-12.

Akınoğlu, A. (2002). Meme Kanserinde Yeni Tanı ve Tedavi Seçenekleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 11,215-224.

Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm Res*, 25(9): 2097-116. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA (2001) A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Physical Therapy*, 81, 1351–1358.

Anonim (2023a). Erişim Adresi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>.

Anonim (2023b). Erişim Adresi: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis>.

Anonim (2023c). Erişim Adresi: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9752>.

Anonim (2023d). Erişim Adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri>.

Anonim (2023e). Erişim Adresi: (<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatmenttypes/radiation/basics.html>).

Aoki, T., ve Narumiya, S. (2012). Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in pharmacological sciences*, 33(6), 304-311.

Apakkan Aksun, S., Bayındır, O. ve Özmen, D. (2001). Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 21, 332-342.

Assefnia, S., Dakshanamurthy, S., Auvil, J. M. G., Hampel, C., Anastasiadis, P. Z., Kallakury, B., Uren, A., Foley, D.W., Brown, M.L., Shapiro, L., Brenner, M., Haigh, D. ve Byers, S. W. (2014). Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget*, 5(6), 1458-1474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1538>

Baioni, E., Scanziani, E., Vincenti, M. C., Leschiera, M., Bozzetta, E., Pezzolato, M., Desiato, R., Bertolini, S., Maurella, C. ve Ru, G. (2017). Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1126-0>

Bakirel, T., Alkan, F. Ü., Üstüner, O., Cinar, S., Yildirim, F., Erten, G. ve Bakirel, U. (2016). Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4), 657-668.

Balkwill, F. ve Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357(9255), 539-545.

Bayramoğlu, G. (2007). Sıçanlarda siklofosamid ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı siltarinin olası koruyucu etkileri. Doktora Tezi, *Eskişehir Osmangazi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir

- Bol, D. K., Rowley, R. B., Ho, C. P., Pilz, B., Dell, J., Swerdel, M., Kiguchi, K., Muga, S., Klein, R. ve Fischer, S. M. (2002). Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. *Cancer Research*, 62(9), 2516-2521.
- Bosanquet, N., Sikora, K. (2004). The economics of cancer care in the UK. *The Lancet Oncology*, 5(9), 568-574.
- Bray, F. ve Møller, B. (2006). Predicting the future burden of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 63-74. <https://doi.org/10.1038/nrc1781>
- Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N. ve Kristensen, A. T. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(19), 586-590.
- Brunelle, M., Sartin, E. A., Wolfe, L. G., Sirois, J. ve Doré, M. (2006). Cyclooxygenase-2 Expression in Normal and Neoplastic Canine Mammary Cell Lines. *Veterinary Pathology*, 43(5), 656–666. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-656>
- Chen, C., Shen, H. L., Yang, J., Chen, Q. Y. ve Xu, W. L. (2010). Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0854-3>
- Chen, J., Liu, S., Li, Q. ve Peng, J. (2015). Combined application of cisplatin and celecoxib inhibits the proliferation and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells resistant to cisplatin. *Xi bao yu fen zi Mian yi xue za zhi= Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 31(2), 203-6.
- Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A. ve Sheldrick, R. L. G. (1994). A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, 47(2), 151-168.
- Cook, K. M. ve Figg, W. D. (2010). Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 60(4), 222-243. <https://doi.org/10.3322/caac.20075>
- Coussens, L. M. ve Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Desai, O., Winkler, J., Minasyan, M. ve Herzog, E.L. (2018). The role of immune and inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 5, 43.
- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A. ve Jemal, A. (2016). Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 66(1), 31-42. <https://doi.org/10.3322/caac.21320>
- Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Doré, M. (2011). Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Veterinary Pathology*, 48(1), 254-265.

- Duffy, M. J. (2006). Estrogen receptors: role in breast cancer. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, 43(4), 325-347.
- Evans, E. R., Bugga, P., Asthana, V. ve Drezek, R. (2018). Metallic nanoparticles for cancer immunotherapy. *Materials Today*, 21(6), 673-685. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.022>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. ve Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal Of Cancer*, 136(5), E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fırat, O., ve Yıldız, İ. (2020). Topoizomeraz ii enzim inhibitörleri. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2), 356-372.
- Finch, S. C. (2007). Radiation-induced leukemia: lessons from history. *Best Practice ve Research Clinical Haematology*, 20(1), 109-118.
- Fischer, J. ve Ganellin, C. R. (2006). *Analogue-based Drug Discovery*, Wiley.
- Fosslien, E. (2000). Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, 37(5), 431-502.
- Foucquier, J. ve Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research Ve Perspectives*, 3(3), e00149. <https://doi.org/10.1002/prp2.149>
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., et al. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(1), 65-70.
- Gao, L., Wang, T. H., Chen, C. P., Xiang, J. J., Zhao, X. B., Gui, R. Y., ve Liao, X. H. (2021). Targeting COX-2 potently inhibits proliferation of cancer cells in vivo but not in vitro in cutaneous squamous cell carcinoma. *Translational Cancer Research*, 10(5), 2219-2228. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-3527>
- García-Aranda, M., ve Redondo, M. (2019). Immunotherapy: a challenge of breast cancer treatment. *Cancers*, 11(12), 1822.
- Gardner, H. L., Fenger, J. M., ve London, C. A. (2016). Dogs as a model for cancer. *Annual Review Of Animal Biosciences*, 4(1), 199-222. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110911>
- González, I. D., Saez, R. S., Rodilla, E. M., Yges, E. L., ve Toledano, F. L. (2000). Hypersensitivity reactions to chemotherapy drugs. *Alergol Immunol Clin*, 15, 161-181.
- Graphpad Prism 10th Version for Windows, Graphpad Software, Boston, Massachusetts USA
- Greaves, M. ve Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313.
- Grüntzig, K., Graf, R., Boo, G., Guscetti, F., Hässig, M., Axhausen, K. W. ve Pospischil, A. (2016). Swiss canine cancer registry 1955–2008: occurrence of the most common

tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development. *Journal Of Comparative Pathology*, 155(2-3), 156-170.

Guo, F., Lin, S. C., Zhao, M. S., Yu, B., Li, X. Y., Gao, Q., Lin, D. J. (2017). microRNA-142-3p inhibits apoptosis and inflammation induced by bleomycin through down-regulation of COX-2 in MLE-12 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50.

Gurnari, C., Voso, M. T., Girardi, K., Mastronuzzi, A., ve Strocchio, L. (2021). Acute promyelocytic leukemia in children: a model of precision medicine and chemotherapy-free therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 642.

Hampe, J.F., Misdrop, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull Wld Hlth Org*, 50: 111-133.

Han, Y., Chen, P., Zhang, Y., Lu, W., Ding, W., Luo, Y. ve Huang, P. (2019). Synergy between auranofin and celecoxib against colon cancer in vitro and in vivo through a novel redox-mediated mechanism. *Cancers*, 11(7), 931. <https://doi.org/10.3390/cancers11070931>.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hagner, N., ve Joerger, M. (2010). Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Management And Research*, 293-301.

Hansen, K., Khanna, C. (2004). Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development, *Eur J Cancer*, 40:858-880.

Harris, I. S., Treloar, A. E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K. C., Mak, T. W. ve ark. (2015). Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell*, 27(2), 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019>

Harris, R. E., Casto, B. C., ve Harris, Z. M. (2014). Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World Journal Of Clinical Oncology*, 5(4), 677. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.677>

HellmÉn, E. (1992). Characterization of four in vitro established canine mammary carcinoma and one atypical benign mixed tumor cell lines. *In Vitro Cellular ve Developmental Biology-Animal*, 28, 309-319. <https://doi.org/10.1007/BF02877054>

Hellmen, E. (1996). The pathogenesis of canine mammary tumors. *The Cancer Journal (Print)*, 9(6), 282-286.

Hellmén, E., Moller, M., Blankenstein, M. A., Andersson, L., ve Westermarck, B. (2000). Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. *Breast Cancer Research and Treatment*, 61, 197-210. <https://doi.org/0.1023/A:1006410020384>

Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., Plaen, E. D., ve Eynde, B. J. V. den. (2017). Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunology Research*, 5(8), 695–709. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0400>

Holliday, D. L., Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13, 1-7.

IBM SPSS Statistics Version 25. IBM Corp.

Ji, X. K., Madhurapantula, S. V., He, G., Wang, K. Y., Song, C. H., Zhang, J. Y., ve Wang, K. J. (2021). Genetic variant of cyclooxygenase-2 in gastric cancer: More inflammation and susceptibility. *World Journal of Gastroenterology*, 27(28), 4653.

Jin, J., Wu, X., Yin, J., Li, M., Shen, J., Li, J. ve Qu, L. (2019). Identification of genetic mutations in cancer: challenge and opportunity in the new era of targeted therapy. *Frontiers in Oncology*, 9, 263.

Kalaycı, A. (2002). Kanseröz ve nonkanseröz insan larinks dokularında süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Yayınlanmış doktora tezi, Konya.

Kamijo, T., Sato, T., Nagatomi, Y., ve Kitamura, T. (2001). Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cell lines. *International Journal of Urology*, 8(7), 35-39. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2042.2001.00332.x>.

Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'Tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., Hampe, C., ve Issad, T. (2013). O-GlcNAcylation-Inducing Treatments Inhibit Estrogen Receptor α Expression and Confer Resistance to 4-OH-Tamoxifen in Human Breast Cancer-Derived MCF-7 Cells. *Plos One*, 8(7), e69150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069150>.

Kao, J., Sikora, A. T., ve Fu, S. (2009). Dual EGFR and COX-2 inhibition as a novel approach to targeting head and neck squamous cell carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 9(8), 931-937.

Karaağaç, E. (2006). Lokal ileri ve metastatik meme kanseri olan hastalarda bir apoptozis göstergesi olan serum kırılmış sitokeratin 18 düzeylerinin, tedaviye yanıtla ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi. Uludağ Üniversitesi, Bursa.

Karabacak, Ü. (2004). Meme kanserli hastalarda konforu destekleyici hemşirelik bakımının ve eğitimin radyoterapi uygulaması ile etkileşimi. *Hemşirelik Programı Yayınlanmamış Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, Türkiye.*

Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., ve Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 4, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>

Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y., ve Murata, M. (2017). Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(8), 1808.

Kayaalp, S. O. (2000). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 1. cilt. Hacettepe-Taş Kitapçılık Limited Şti.

Ke, J., Yang, Y., Che, Q., Jiang, F., Wang, H., Chen, Z., Wan, X. ve ark. (2016). Prostaglandin E2 (PGE2) promotes proliferation and invasion by enhancing SUMO-1 activity via EP4 receptor in endometrial cancer. *Tumor Biology*, 37(9), 12203-12211. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5087-x>.

Kerschbaumer, J., Schmidt, F. A., Grams, A. E., Nowosielski, M., Pinggera, D., Brawanski, K. R., ... ve Freyschlag, C. F. (2015). Dual anti-angiogenic chemotherapy with temozolomide and celecoxib in selected patients with malignant glioma not eligible for standard treatment. *Anticancer Research*, 35(9), 4955-4960.

Klein, C. A. (2020). Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 681-694.

Koçak S, (2000) "Kimler Meme Kanseri Olur?", *Klinik Bilimler ve Doktor*, Ocak, 6 (1), s:68-72.

Kong, Y., Gu, C., Zhong, D., Zhao, X., Lin, Q., Wang, K., Xun, T., Yu, L., ve Liu, S. (2016). Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of oxaliplatin in human esophageal cancer cells by impairing the drug influx. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.009>.

Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Tamura, N., Mori, K. (1997). Structural organization of the human prostaglandin EP3Receptor subtype gene (PTGER3). *Genomics*, 40(3), 425-434.

Küçüçük S. Meme kanserinin tedavisinde radyoterapinin yeri. . Onkoloji Hemşireliği Sempozyumu Özet Kitabı. İ. Ü. Onkoloji Enstitüsü, İ. Ü. F.N.H.Y.O., İ.Ü. Tıp Fakültesi, İstanbul, 2003.

Kulkarni, S., Rader, J. S., Zhang, F., Liapis, H., Koki, A. T., Masferrer, J. L., Dannenberg, A. J. (2001). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(2), 429-434. PMID: 11234900.

Langley, R. R., ve Fidler, I. J. (2007). Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocrine Reviews*, 28(3), 297-321.

Lavalle, G. E., Bertagnolli, A. C., Tavares, W. L. F., ve Cassali, G. D. (2009). COX-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46(6), 1275-1280.

Leahy, K.M., Ornberg, R.L., Wang, Y., Zweifel, B.S., Koki, A.T., Masferrer, J.L. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Research*, 62(3), 625-631.

Lee, J. L., Kim, A., Kopelovich, L., Bickers, D. R., ve Athar, M. (2005). Differential expression of E prostanoid receptors in murine and human non-melanoma skin cancer. *Journal Of Investigative Dermatology*, 125(4), 818-825.

Lewis, M. P., Lygoe, K. A., Nystrom, M. L., Anderson, W. P., Speight, P. M., Marshall, J. F., Thomas, G. (2004). Tumour-derived TGF-β1 modulates myofibroblast

differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British Journal Of Cancer*, 90(4), 822-832.

Li, S., Jiang, M., Wang, L., ve Yu, S. (2020). Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 129, 110389.

Liu, H., Li, W., Rose, M. E., Hickey, R. W., Chen, J., Uechi, G. T., Graham, S. H. (2015). The point mutation UCH-L1 C152A protects primary neurons against cyclopentenone prostaglandin-induced cytotoxicity: implications for post-ischemic neuronal injury. *Cell Death Ve Disease*, 6(11), e1966-e1966.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D. ve Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 2(1), 1-9.

Lovelock, J. E., ve Bishop, M. W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394-1395.

Lu, Y., ve Mahato, R. I. (Eds.). (2009). Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics. Springer Science ve Business Media.

McAdam, B. F., Catella-Lawson, F., Mardini, I. A., Kapoor, S., Lawson, J. A. ve FitzGerald, G. A. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 272-277. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.272>

Misdrop, W., Else, R.W., Hellmén, E. ve Lipscomb, T.P. (1999) Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. 2nd edn, vol VII. Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington, DC, USA.

Molina, M. A., Sitja-Arnau, M., Lemoine, M. G., Frazier, M. L., ve Sinicrope, F. A. (1999). Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Research*, 59(17), 4356-4362. PMID: 10485483

Moulton, E. J. (1990). Tumors of the mammary gland. *Tumors In Domestic Animals*, 518-552.

Najafi, M., Goradel, N. H., Farhood, B., Salehi, E., Solhjoo, S., Toolee, H., Kharazinejad, E. ve Mortezaee, K. (2019). Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5700-5721.

Nakopoulou, L., Mylona, E., Papadaki, I., Kapranou, A., Giannopoulou, I., Markaki, S. ve Keramopoulos, A. (2005). Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a favorable prognostic phenotype in breast carcinoma. *Pathobiology*, 72(5), 241-249. <https://doi.org/10.1159/000089418>.

O'callaghan, G., Houston, A. (2015). Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *British Journal of Pharmacology*, 172(22), 5239-5250.

Özkan S, Keskinliç B, Gültekin M, Karaca A.S, Öztürk C, Boztaş G. (2014). Meme Kanseri Taramaları; Ulusal Kanser kontrol Planı 2013-2018. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.

Pang, L. Y., Cervantes-Arias, A., Else, R. W., ve Argyle, D. J. (2011). Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo- Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers*, 3(2), 1744–1762. <https://doi.org/10.3390/cancers3021744>

Park, M., ve Hong, J. (2016). Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>

Parkin, D. M., Whelan, S. L., Ferlay, J., Teppo, L., ve Thomas, D. B. E. (2002). Cancer incidence in five continents volume VIII. *IARC Sci. Publications*, 155.

Patel, A. (2020). Benign vs malignant tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>.

Perroud, H. A., Alasino, C. M., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Queralt, F., Pezzotto, S. M., Rozados, V. R., ve Graciela Scharovsky, O. (2015). Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: clinical outcomes and biomarkers of response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(2), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2947-9>.

Pu, D., Yin, L., Huang, L., Qin, C., Zhou, Y., Wu, Q., ... ve Li, L. (2021). Cyclooxygenase-2 inhibitor: a potential combination strategy with immunotherapy in cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 637504.

Queiroga, F. L., Raposo, T., Carvalho, M. I., Prada, J., ve Pires, I. (2011). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*, 25(3), 455-465.

Rayburn, E. R., Ezell, S. J., ve Zhang, R. (2009). Anti-inflammatory agents for cancer therapy. *Molecular And Cellular Pharmacology*, 1(1), 29-43. <https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.09.05>.

Reif, R., A'Amar, O., ve Bigio, I. J. (2007). Analytical model of light reflectance for extraction of the optical properties in small volumes of turbid media. *Applied Optics*, 46(29), 7317-7328.

Riss, T. (2017). Is your MTT assay really the best choice. *Promega™, Madison, Wisconsin, United States*).

Riss, T. L., Moravec, R. A., ve Niles, A. L. (2013). Cell viability assays In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K. et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda, MD, USA: Eli Lilly ve Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Roberts, H. R., Smartt, H. J., Greenhough, A., Moore, A. E., Williams, A. C., ve Paraskeva, C. (2011). Colon tumour cells increase PGE 2 by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. *Carcinogenesis*, 32(11), 1741-1747. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr210>.

- Robledo-Cadena, D. X., Gallardo-Pérez, J. C., Dávila-Borja, V., Pacheco-Velázquez, S. C., Belmont-Díaz, J. A., Ralph, S. J. ve Rodríguez-Enríquez, S. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase cisplatin, paclitaxel, and doxorubicin efficacy against human cervix cancer cells. *Pharmaceuticals*, *13*(12), 463. <https://doi.org/10.3390/ph13120463>.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M. G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IκB kinase. *Nature*, *403*(6765), 103-108.
- Roy, P. S., ve Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal Of Cancer*, *53*(3), 441-442. <https://doi.org/10.4103/0019-509x.200658>.
- Rundhaug, J. E., Simper, M. S., Surh, I., Fischer, S. M. (2011). The role of the EP receptors for prostaglandin E 2 in skin and skin cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *30*, 465-480.
- Santen, R. J., ve Allred, D. C. (2007). The estrogen paradox. *Nature Clinical Practice Endocrinology ve Metabolism*, *3*(7), 496-497.
- Shacter, E., ve Weitzman, S. A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*, *16*(2), 217-26.
- Shi, L., Xu, L., Wu, C., Xue, B., Jin, X., Yang, J., ve Zhu, X. (2018). Celecoxib-induced self-assembly of smart albumin-doxorubicin conjugate for enhanced cancer therapy. *ACS Applied Materials Ve Interfaces*, *10*(10), 8555-8565. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b00875>.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., ve Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review Of Biochemistry*, *69*(1), 145-182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>.
- Sopik, V., Sun, P., ve Narod, S. A. (2018). Impact of microinvasion on breast cancer mortality in women with ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Research And Treatment*, *167*, 787-795. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4572-2>.
- Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., ve Koki, A. T. (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, *89*(12), 2637-2645. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20001215\)89:12<2637::aid-cnrc17>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20001215)89:12<2637::aid-cnrc17>3.0.co;2-b).
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal Of Cancer Science ve Therapy*, *1*(2), 1-7. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Thike, A. A., Brogi, E., Harada, O., Oyama, T., ve Tse, G. (2019). Fibroadenoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. WHO Classification of Tumours. 5th ed. IARC Press; Lyon, France: *Breast Tumours*, 82–101.

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., ve Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e32833ffb56>.

Tołoczko-Iwaniuk, N., Dziemiańczyk-Pakiela, D., Nowaszewska, B. K., Celińska-Janowicz, K., ve Miltyk, W. (2019). Celecoxib in cancer therapy and prevention—review. *Current Drug Targets*, 20(3), 302-315.

Torgovnick, A., Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 6, 157.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., ve Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 65(2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

Tsujii, M., ve DuBois, R. N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3), 493-501. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90127-2).

Van Leeuwen, I. S., Hellmen, E., Cornelisse, C. J., Van Den Burgh, B. A. R. T., ve Rutteman, G. R. (1996). P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research*, 16(37373744).

van Wijngaarden, J., van Beek, E., van Rossum, G., van der Bent, C., Hoekman, K., van der Pluijm, G., van der Pol, M. A., Broxterman, H. J., van Hinsbergh, V. W. M., ve Löwik, C. W. G. M. (2007). Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF- κ B-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. *European Journal of Cancer*, 43(2), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.09.010>.

Vincent, T. L., ve Gatenby, R. A. (2008). An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 32(4), 729-737. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.4.729>.

Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., ve Catoi, C. (2016). In vitro comparative models for canine and human breast cancers. *Clujul Medical*, 89(1), 38.

Wang, B., Wang, J., Huang, S. Q., Su, H. H., ve Zhou, S. F. (2009). Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance. *Current Drug Metabolism*, 10(7), 781-834. <https://doi.org/10.2174/138920009789895480>

Weiss, R. B. (1992, December). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *In Seminars In Oncology* (Vol. 19, No. 6, pp. 670-686).

Williams, S. T., Wells, G., Conroy, S., Gagg, H., Allen, R., Rominiyi, O., ve Danson, S. J. (2022). Precision oncology using ex vivo technology: a step towards individualised cancer care?. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1-48.

Wong, R.S. (2019). Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in cancer prevention and cancer promotion. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, Article ID 3418975, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/3418975>.

Wu, Y., ve Zhou, B. P. (2010). TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 102(4), 639–644. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605530>.

Xiao, H. ve Yang, C. S. (2008). Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention. *International Journal of Cancer*, 123(5), 983-990.

Xu, Z., Choudhary, S., Voznesensky, O., Mehrotra, M., Woodard, M., Hansen, M., Herschman, H., ve Pilbeam, C. (2006). Overexpression of COX-2 in Human Osteosarcoma Cells Decreases Proliferation and Increases Apoptosis. *Cancer Research*, 66(13), 6657–6664. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-3624>.

Yang, C.-X., Xing, L., Chang, X., Zhou, T.-J., Bi, Y.-Y., Yu, Z.-Q., Zhang, Z.-Q., ve Jiang, H.-L. (2020). Synergistic Platinum (II) Prodrug Nanoparticles for Enhanced Breast Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 17(4), 1300–1309. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01318>.

Yao, C., ve Narumiya, S. (2019). Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 176(3), 337-354.

Yıldırım, N. (2017). Over Kanserlerinde Peritoneal Metastaz Sürecinde Mezenkimal-Epitelial Tranzisyonun Moleküler Mekanizması. Doktora Tezi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.

Zappavigna, S., Cossu, A. M., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G. A., Nicoletti, G. F. ve Caraglia, M. (2020). Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(7), 2605.

Zappulli, V., Peña, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M.H., Gama, A. *et al.* (2019). Mammary tumors. in *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals* ed. Kiupel, M. 4th Edit, Vol 2, Davis-Thompson Foundation, Gurnee.